

Nuevo manual para la medición estandarizada de caracteres funcionales de plantas

N. Pérez-Harguindeguy^{A,Y}, S. Díaz^A, E. Garnier^B, S. Lavorel^C, H. Poorter^D, P. Jaureguiberry^A, M. S. Bret-Harte^E, W. K. Cornwell^F, J. M. Craine^G, D. E. Gurvich^A, C. Urcelay^A, E. J. Veneklaas^H, P. B. Reich^I, L. Poorter^J, I. J. Wright^K, P. Ray^L, L. Enrico^A, J. G. Pausas^M, A. C. de Vos^F, N. Buchmann^N, G. Funes^A, F. Quétier^{A,C}, J. G. Hodgson^O, K. Thompson^P, H. D. Morgan^Q, H. ter Steege^R, M. G. A. van der Heijden^S, L. Sack^T, B. Blonder^U, P. Poschlod^V, M. V. Vaieretti^A, G. Conti^A, A. C. Staver^W, S. Aquino^X and J. H. C. Cornelissen^F

^A Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (CONICET-UNC) and FCEfyN, Universidad Nacional de Córdoba, CC 495, 5000 Córdoba, Argentina.

^B CNRS, Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (UMR 5175), 1919, Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

^C Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR 5553 du CNRS, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France.

^D Plant Sciences (IBG2), Forschungszentrum Jülich, D-52425 Jülich, Germany.

^E Institute of Arctic Biology, 311 Irving I, University of Alaska Fairbanks, Fairbanks, AK 99775-7000, USA.

^F Systems Ecology, Faculty of Earth and Life Sciences, Department of Ecological Science, VU University, De Boelelaan 1085, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands.

^G Division of Biology, Kansas State University, Manhattan, KS 66506, USA.

^H Faculty of Natural and Agricultural Sciences, School of Plant Biology, The University of Western Australia, 35 Stirling Highway, Crawley, WA 6009, Australia.

^I Department of Forest Resources, University of Minnesota, 1530N Cleveland Avenue, St Paul, MN 55108, USA and Hawkesbury Institute for the Environment, University of Western Sydney, Locked Bag 1797, Penrith, NSW 2751, Australia.

^J Centre for Ecosystems, Forest Ecology and Forest Management Group, Wageningen University, PO Box 47, 6700 AA Wageningen, The Netherlands.

^K Department of Biological Sciences, Macquarie University, Sydney, NSW 2109, Australia.

^L Department of Biological Sciences, Stanford University, Stanford, CA, USA.

^M Centro de Investigaciones sobre Desertificación (CIDE-CSIC), IVIA Campus, Carretera Nàquera km 4.5, 46113 Montcada, Valencia, Spain.

^N Institute of Agricultural Sciences, ETH Zurich, Universitätstrasse 2, LFW C56, CH-8092 Zürich, Switzerland.

^O Peak Science and Environment, Station House, Leadmill, Hathersage, Hope Valley S32 1BA, UK.

^P Department of Animal and Plant Sciences, The University of Sheffield, Sheffield S10 2TN, UK.

^Q NSW Department of Primary Industries, Forest Resources Research Beecroft, NSW 2119, Australia.

^R Naturalis Biodiversity Center, Leiden, and Institute of Environmental Biology, Ecology and Biodiversity Group, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.

^S Ecological Farming Systems, Agroscope Reckenholz Tänikon, Research Station ART, Reckenholzstrasse 191, 8046 Zurich, Switzerland and Plant-Microbe Interactions, Institute of Environmental Biology, Faculty of Science, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.

^T Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of California, Los Angeles, 621 Charles E. Young Drive South, Los Angeles, CA 90095-1606, USA.

^U Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Arizona, Tucson, AZ, USA.

^V Institute of Botany, Faculty of Biology and Preclinical Medicine, University of Regensburg, D-93040, Regensburg, Germany.

^W Department of Ecology and Evolutionary Biology, Princeton University, Princeton, NJ 08544, USA.

^X Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE 7170, Cartago, Turrialba 30501, Costa Rica.

^Y Corresponding author. Email: nperez@com.uncor.edu

Resumen. Los caracteres funcionales de plantas son los atributos (morfológicos, fisiológicos, fenológicos) que representan las estrategias ecológicas y determinan cómo las plantas responden a los factores ambientales, afectan a otros niveles tróficos e influyen las propiedades del ecosistema. La variación en los caracteres funcionales de plantas, y síndromes de caracteres, han sido útiles para abordar muchas preguntas ecológicas importantes a diversas escalas, dando lugar a una demanda de métodos estandarizados para medir caracteres funcionales de plantas con significado ecológico. Esta línea de investigación ha estado entre las más fructíferas formas de comprender los patrones y procesos ecológicos y evolutivos. También tiene el potencial tanto de construir un conjunto predictivo de relaciones locales, regionales y globales entre plantas y ambiente, como de cuantificar un amplio rango de procesos (sean estos motivados por factores naturales o humanos), incluyendo cambios en la biodiversidad, impactos de las especies invasoras, alteraciones en los procesos biogeoquímicos y de las interacciones entre la vegetación y la atmósfera. La importancia de estos temas determina la urgente necesidad de más y mejores datos, e incrementa el valor de los protocolos estandarizados para cuantificar las variaciones de los caracteres de las diferentes especies, en particular para caracteres con la capacidad de predecir procesos a nivel de planta y de ecosistema, y para caracteres que pueden ser medidos con relativa facilidad. Este manual, que es una versión actualizada y expandida de la ampliamente usada versión previa, conserva el foco sobre las recetas “paso a paso” claramente presentadas, y ampliamente aplicables, con un mínimo de texto sobre la teoría; y no sólo incluye métodos actualizados para los caracteres tratados en aquella versión, sino que también presenta nuevos protocolos para más caracteres. Este nuevo manual tiene un mejor balance entre caracteres de plantas enteras, caracteres foliares, caracteres de raíces y tallos y caracteres regenerativos, y pone particular énfasis en caracteres de importancia para predecir el efecto de las especies sobre propiedades claves del ecosistema. Esperamos que este nuevo manual se convierta en una compañía habitual en los esfuerzos locales y globales para aprender sobre las respuestas e impactos de las diferentes especies de plantas con respecto a los cambios ambientales en el presente, pasado y futuro.

Palabras clave: biodiversidad, ecofisiología, dinámica de los ecosistemas, funciones de los ecosistemas, cambio ambiental, morfología de plantas.

Índice

Introducción y discusión	3	3.10. Tasa fotosintética en saturación de luz	43
1. Selección de especies e individuos	4	3.11. Respiración foliar en oscuridad	43
1.1. Selección de especies	4	3.12. Vía metabólica fotosintética	44
1.2. Selección de individuos dentro de especies.....	7	3.13. Composición de isótopos de carbono como medida de la eficiencia intrínseca en el uso de agua ..	46
1.3. Medición de réplicas.....	7	3.14. Pérdida de electrolitos como indicador de la sensibilidad a las heladas	47
2. Caracteres de planta	7	3.15. Potencial hídrico foliar como una medida del estatus hídrico de la planta	49
2.1. Historia de vida y longevidad máxima	7	3.16. Palatabilidad de hojas en función de la preferencia por herbívoros modelo	51
2.2. Forma de vida.....	9	3.17. Descomponibilidad de broza	52
2.3. Forma de crecimiento	9	4. Caracteres del tallo	56
2.4. Altura de la planta	11	4.1. Densidad específica del tallo	56
2.5. Clonalidad, banco de yemas y órganos de almacenamiento subterráneos	13	4.2. Contenido de materia seca y tiempo de secado de ramas terminales	58
2.6. Espinosidad.....	14	4.3. Espesor de la corteza (y calidad de corteza)	59
2.7. Arquitectura de la planta	15	4.4. Conductividad del xilema	60
2.8. Relación área foliar:área de albura	16	4.5. Vulnerabilidad al embolismo	62
2.9. Proporción de biomasa invertida en raíces	17	5. Caracteres de raíces y órganos subterráneos	63
2.10. Resistencia a la salinidad	18	5.1. Longitud específica de la raíz	64
2.11. Tasa de crecimiento relativo y sus componentes	19	5.2. Morfología del sistema radical	65
2.12. Inflamabilidad de plantas	21	5.3. Estrategia de absorción de nutrientes	67
2.13. Caracteres relacionados al uso del agua	24	6. Caracteres regenerativos	67
3. Caracteres de hojas	27	6.1. Síndrome de dispersión	67
3.1. Área foliar específica	27	6.2. Tamaño y forma del propágulo	68
3.2. Área foliar	31	6.3. Potencial de dispersión	69
3.3. Contenido de materia seca foliar	32	6.4. Masa de la semilla	70
3.4. Espesor foliar	32	6.5. Morfología funcional de la plántula	71
3.5. pH de hojas verdes o de la hojarasca	34	6.6. Capacidad de rebrote luego de un disturbio	72
3.6. Concentración de nitrógeno foliar y fósforo foliar	35	Agradecimientos	73
3.7. Resistencia física de las hojas	36	Referencias	74
3.8. Longevidad y duración del follaje verde	39	Apéndice I	91
3.9. Densidad de nervaduras	42		

Introducción y discusión

Los cambios ambientales globales tales como los cambios en el clima y en la composición de la atmósfera, en el uso de la tierra y los intercambios bióticos están desencadenando cambios sin precedentes en los ecosistemas. La necesidad de entender y predecir todas estas transformaciones ha dado un nuevo estímulo a la larga tradición del estudio de las características de las plantas (caracteres) que reflejan las estrategias ecológicas de las especies y que determinan cómo esas plantas responderán a distintos factores ambientales, cómo afectarán a otros niveles tróficos, o cómo influirán en las propiedades de un ecosistema (Kattge *et al.* 2011). Existe cada vez más evidencia de que la variación en las características de las plantas, y en los síndromes de asociación de estas características, tanto dentro como entre especies, puede afectar a diversos procesos ecosistémicos a distintas escalas. Como resultado de esto, existe en la actualidad una fuerte demanda de métodos estandarizados de medición de caracteres de plantas con significado ecológico. El predecesor del presente manual (Cornelissen *et al.* 2003) fue escrito con el objetivo de responder a esa necesidad. En el trabajo de Cornelissen *et al.* (2003) se presentaban ‘recetas’ para la medición de caracteres de manera estandarizada y simple de manera de poder ser utilizadas por investigadores de distintos lugares del mundo y sobre distintas floras. La presente versión actualizada es una extensión de esa iniciativa colectiva global, y posee un alcance aún más amplio.

La identificación de compromisos generales en las características de las plantas, de síndromes de asociación de esas características y su relación con las estrategias ecológicas de especies en distintas floras, taxa y ecosistemas ha sido el foco de numerosos estudios en ecología vegetal. Así, estas preguntas han atraído el interés de numerosos investigadores en la últimas décadas (Chapin *et al.* 1993; Grime *et al.* 1997; Reich *et al.* 1997; Cornelissen *et al.* 1999; Aerts and Chapin 2000; Westoby *et al.* 2002; Díaz *et al.* 2004; Wright *et al.* 2004; Cornwell *et al.* 2008; Baraloto *et al.* 2010a; Freschet *et al.* 2010; Ordóñez *et al.* 2010; Kattge *et al.* 2011, entre otros). Existe abundante evidencia de que

los caracteres de las plantas y sus síndromes de asociación afectan significativamente los procesos y servicios ecosistémicos (para resúmenes del tema ver Lavorel and Garnier 2002; Díaz *et al.* 2007; Chapin *et al.* 2008; De Bello *et al.* 2010; Cardinale *et al.* 2012). Como consecuencia, las aproximaciones basadas en caracteres han ganado impulso en los campos de la agronomía y las ciencias forestales (por ej. Brussaard *et al.* 2010; Garnier and Navas 2012), la ecología de la conservación (por ej. Mace *et al.* 2010), los estudios arqueobotánicos (por ej. Jones *et al.* 2010) e incluso en la interfase entre la evolución y la ecología de las comunidades y los ecosistemas (por ej. Edwards *et al.* 2007; Cavender-Bares *et al.* 2009; Faith *et al.* 2010; Srivastava *et al.* 2012).

La cuantificación de los cambios en la vegetación ante las modificaciones en el clima a escala global ha mejorado significativamente a través del uso de modelos dinámicos de vegetación global (o DGVMs por sus siglas en inglés) (Cramer *et al.* 2001; Arneeth *et al.* 2010). Sin embargo, los actuales modelos dinámicos de vegetación global no han incorporado aún la variación continua en los caracteres de las plantas, ni a nivel de especie y tampoco a nivel de tipos funcionales (Cornwell *et al.* 2008). Las próximas generaciones de modelos podrían beneficiarse con la incorporación de caracteres funcionales y síndromes que sean suficientemente simples y generales como para ser analizados a escala regional o global, y al mismo tiempo suficientemente informativos como para relacionarlos con la dinámica biogeoquímica, la dispersión y los disturbios a gran escala (Ollinger *et al.* 2008; Stich *et al.* 2008; Doherty *et al.* 2010; Harrison *et al.* 2010; Ma *et al.* 2010).

Como consecuencia de esta explosión de interés tanto práctico como teórico, ha habido una rápida expansión en el desarrollo de bases de datos a nivel regional y global (por ej. Díaz *et al.* 2004; Wright *et al.* 2004; Kleyer *et al.* 2008; Cornwell *et al.* 2008; Chave *et al.* 2009; Paula *et al.* 2009; Baraloto *et al.* 2010a; Zanne *et al.* 2010; Fortunel *et al.* 2012; Patiño *et al.* 2012). En particular la Iniciativa TRY (Kattge *et al.* 2011; ver también Caja 1) está recopilando una base de datos comunitaria de caracteres de plantas a nivel

Caja 1. Enlaces útiles para quienes trabajan con caracteres funcionales de plantas

Para encontrar protocolos y actualizaciones en línea relacionadas con este manual: Núcleo Diversus/Nuevo Manual de Caracteres (<http://www.nucleodiversus.org/index.php?mod=page&id=79>)

Para enviar comentarios, sugerencias y correcciones sobre los manuscritos descritos en esta página comuníquese con: traitshandbook@gmail.com

Si está buscando protocolos complementarios a los aquí descritos para medir características (eco-) fisiológicas así como para mediciones ambientales consulte la página de Prometheus Wiki (Sack *et al.* 2010; <http://prometheuswiki.publish.csiro.au/tiki-index.php>).

Si está interesado en compartir datos sobre caracteres funcionales de plantas (tanto para proveerlos como para consultarlos) comuníquese con TRY Worldwide Initiative and Database (Kattge *et al.* 2011; www.try-db.org).

Si su objetivo es realizar cálculos de indicadores de diversidad funcional a partir de datos de caracteres, diríjase a FDiversity Free Software Package (Casanoves *et al.* 2011; www.fdiversity.nucleodiversus.org).

mundial. Esta iniciativa constituye un paso sin precedentes para mejorar la capacidad de la comunidad científica para acceder y utilizar la información sobre caracteres de plantas. En este contexto, la estandarización de protocolos aplicables a situaciones y contextos geográficos muy diversos se torna aún más importante que en el pasado.

En este manual consideramos que un carácter funcional de planta (también rasgo funcional o característica funcional en castellano) es toda característica morfológica, fisiológica o fenológica, medible a nivel de individuo, desde el nivel de célula al nivel de organismo, y con potencial para afectar su desempeño ecológico (McGill *et al.* 2006; Lavorel *et al.* 2007; Violle *et al.* 2007) así como de afectar al ambiente donde se desarrolla ese individuo (Lavorel and Garnier 2002). Tal como proponen Lavorel *et al.* (2007) llamamos 'atributo' al valor particular que toma un carácter en un lugar y en un tiempo dado. Los caracteres funcionales abordados en este manual incluyen desde indicadores muy simples del funcionamiento de una planta en el ecosistema (por ej. concentración de nutrientes como indicador tanto de tasas metabólicas como de la calidad de ese material como alimento para herbívoros) hasta medidas de funcionamiento en sí mismas (por ej. palatabilidad, descomponibilidad, capacidad de rebrote después del fuego), siempre que sean medidas a nivel de especie. Los caracteres contenidos en este manual constituyen un grupo de caracteres funcionales de plantas vasculares que: (1) pueden, al mismo tiempo, representar respuestas claves a cambios ambientales así como efectos clave de las especies sobre procesos y servicios ecosistémicos a distintas escalas, (2) pueden contribuir a responder preguntas de teoría ecológica y evolución al mismo tiempo que preguntas prácticas relacionadas con la conservación y con el manejo del paisaje (ver Caja 2 para una discusión sobre este punto), y (3) en la mayoría de los casos representan mediciones simples, económicas y estandarizadas que pueden ser fácilmente repetidas en muchos biomas y regiones.

El manual que aquí presentamos es un 'libro de recetas' que puede ser usado tanto en el campo como en el laboratorio. Contiene protocolos detallados, paso por paso, para la medición directa e, idealmente, inequívoca de caracteres funcionales de plantas en distintos biomas terrestres. Para lograr este objetivo debimos tomar algunas decisiones difíciles. Por un lado, no presentamos una lista exhaustiva de todos los caracteres que potencialmente podrían medirse, ni tampoco pretendemos brindar una descripción minuciosa de la teoría por detrás de cada carácter. El presente manual se concentra en caracteres y métodos que han sido consensuadamente identificados como útiles, confiables, y factibles de ser aplicados a esfuerzos comparativos a gran escala. Algunos de estos caracteres son muy conocidos y han sido ampliamente usados, mientras que otros, representan métodos relativamente novedosos. Hemos puesto particular

énfasis en aquellos protocolos apropiados para áreas con gran riqueza de especies, con floras parcialmente conocidas, y con presupuestos modestos. Dentro de la receta de cada carácter presentamos un resumido contexto ecológico y una corta lista de referencias que pueden brindar más detalles en relación al significado del carácter, la metodología utilizada y la existencia de bases de datos que lo incluyen. La sección principal de la receta contiene un protocolo breve y estandarizado, y bajo el título *Casos especiales y extras*, brindamos indicaciones relativas a métodos o parámetros adicionales así como sugerencias para proceder en casos especiales, ya sean situaciones especiales de campo o especies con características particulares. Aquellos lectores que estén interesados pueden encontrar métodos complementarios a los presentados en este manual, así como discusiones y comentarios relacionados, en las páginas de internet indicadas en la Caja 1. Debemos aclarar que no hemos incluido citas específicas dentro de las recetas de cada carácter. Esperamos que los autores de las publicaciones relevantes (muchos de ellos citados al final de cada receta) sepan comprender esta elección, hecha sólo para simplificar y abreviar el texto, pero en completo reconocimiento de la importancia que cada uno de ellos y muchos otros han realizado a la teoría y a los procesos de medición de los caracteres aquí presentados.

Este nuevo manual al mismo tiempo actualiza la teoría, los métodos y las bases de datos cubiertas por su predecesor (Cornelissen *et al.* 2003), y brinda protocolos para varios caracteres funcionales adicionales, en particular para aquellos que son medidos en órganos distintos de la hoja. Al mismo tiempo, el presente manual tiene una mejor cobertura de (1) métodos de medición apropiados para ser usados en biomas y ecosistemas poco estudiados hasta el momento, (2) floras con adaptaciones especiales y (3) funciones de las plantas relacionadas con el reciclado de carbono y nutrientes, la herbivoría, la dinámica del agua y el fuego. Esperamos que el foco en técnicas prácticas y recetas simplificadas sirva para que este manual se transforme en una fuente de consulta útil para estudios de laboratorio y de campo en todo el mundo. Alentamos a los usuarios a que compartan sus experiencias e impresiones con nosotros tanto sobre cuestiones generales del manual como sobre detalles específicos de los protocolos (ver Caja 1), para que la próxima edición de este manual sea aun mejor como compañero de trabajo!!!

1 Selección de especies e individuos

La siguiente sección es una guía para seleccionar especies (e individuos dentro de las especies) con el objetivo de realizar mediciones de caracteres funcionales. También se presentan algunas consideraciones generales sobre el número de réplicas. Finalmente, en el Apéndice 1 hemos listado el número de réplicas recomendado para cada carácter.

1.1 Selección de especies

Los objetivos de cada investigación son los que, en última instancia, determinarán sobre qué especies realizar mediciones de caracteres. Por ejemplo, para analizar la variación en los valores de caracteres a nivel de especie, identificar estrategias o síndromes generales de uso de recursos, o analizar compromisos entre caracteres a escala local, regional o global (por ejemplo Reich *et al.* 1997; Westoby

et al. 1998; Díaz *et al.* 2004; Wright *et al.* 2004; Gubsch *et al.* 2011), recomendamos seleccionar especies o poblaciones de una amplia variedad de ambientes y grupos filogenéticos. Si las preguntas son de tipo macroevolutivo, por ejemplo sobre la historia evolutiva de ciertos atributos funcionales, o las transformaciones de los síndromes adaptativos de diferentes linajes a lo largo de su historia, la selección de especies deberá tener en cuenta criterios filogenéticos, como

Caja 2. ¿Por qué medir caracteres de plantas? ¿Qué caracteres medir?

Los caracteres funcionales de plantas brindan una mejor percepción de las restricciones y las oportunidades que encuentran las plantas en diferentes hábitats que la imagen ofrecida por la identidad taxonómica (Southwood 1977; Grime 1979). Los caracteres funcionales permiten comprender como la biodiversidad funcional, en un sentido amplio de su significado, se relaciona con los procesos ecosistémicos y con los beneficios que las personas derivan de ellos (Chapin *et al.* 2000; Díaz *et al.* 2007). Al mismo tiempo, estos caracteres ofrecen la oportunidad de comparar ecosistemas distantes con muy poca superposición taxonómica (Reich *et al.* 1997; Díaz *et al.* 2004; Cornwell *et al.* 2008). Muchas veces, este enfoque de caracteres, permite una comprensión única de preguntas teóricas y prácticas, aunque no necesariamente de manera menos laboriosa o más económica que otros enfoques.

¿Qué caracteres medir para responder a qué preguntas?

Evidentemente ningún manual podría indicar de manera inequívoca cuáles son los caracteres adecuados a medir. La respuesta dependerá de las preguntas del investigador, de las características ecológicas y de la escala del área de estudio, así como de circunstancias prácticas. Por ejemplo, no tiene mucho sentido comparar la suculencia de especies dentro un ambiente muy húmedo, o la inflamabilidad dentro de un área que se quema muy raras veces. Estas mismas comparaciones, sin embargo, pueden ser muy interesantes como referencia en estudios a gran escala geográfica. En realidad, más que limitar la curiosidad de los investigadores, el objetivo de este manual es más bien inspirar a aquellos que puedan desarrollar nuevos métodos de medición no cubiertos en este trabajo de manera de poder responder cada vez más preguntas nuevas e interesantes en el futuro. Algunos ejemplos de caracteres interesantes no incluidos aquí se pueden encontrar en el texto introductorio del trabajo de Cornelissen *et al.* (2003).

Probablemente el principal criterio para decidir qué caracteres medir es el proceso que nos interesa. Por ejemplo: ¿El estudio apunta al diseño fundamental de plantas u órganos en respuesta a la variación ambiental en el presente o apunta a las fuerzas evolutivas que generaron el actual espectro de diseños? ¿Nos interesa el crecimiento vegetativo, la reproducción o la dispersión a través del paisaje? ¿Nuestros objetivos involucran supervivencia en respuesta a disponibilidad de recursos o a la intensidad de disturbios? ¿La pregunta es acerca de la respuesta a o el efecto de agua, nutrientes, o regímenes de fuego? ¿Nos interesa conocer la retroalimentación que puede ejercer la vegetación sobre la atmósfera y el clima? ¿Queremos estudiar el desempeño de estadios juveniles o la persistencia de adultos? ¿Involucra nuestro estudio a polinizadores, dispersores o herbívoros? ¿Los procesos que queremos predecir ocurren sobre el suelo o en él? ¿Nuestro interés está en detectar grandes diferencias a través de o entre regiones o continentes o sutiles diferencias entre individuos o poblaciones? ¿Queremos analizar o predecir la provisión de determinados servicios ecosistémicos? Todas estas preguntas así como otro tipo de preguntas tendrán impacto en la selección de caracteres a medir.

Aunque no hay ningún límite para el número de caracteres relevantes a ser medidos en los distintos contextos, diversos autores han identificado un pequeño subgrupo que se considera relevante de manera casi universal debido a que son parte fundamental del ciclo de vida de una planta (Grime *et al.* 1997; Westoby 1998). Estos caracteres son el tamaño de la planta (usualmente medido como altura de la planta), el tamaño de la semilla (usualmente medido como masa de la semilla), y la estructura de los tejidos de la hoja (medido como área foliar específica o contenido de materia seca foliar). Además de estos caracteres básicos, existen algunos caracteres que son considerados fundamentales por su importancia en el uso de recursos de las plantas, en la regeneración, en la dispersión o en la respuesta a disturbios (Hodgson *et al.* 1999; McIntyre *et al.* 1999; Weiher *et al.* 1999; Lavorel and Garnier 2002; Knevel *et al.* 2003). Una discusión profunda sobre la pertinencia de cada carácter excede los objetivos de este manual por lo que recomendamos a los interesados la lectura de los artículos mencionados para una primera introducción en el tema. Para preguntas más específicas, el breve contexto ecológico que incluye la descripción de cada caracteres, y más aún las referencias incluidas al final pueden ayudar a la identificación de los caracteres más apropiados. Las consideraciones logísticas y financieras son importantes también. Por ejemplo, si los recursos son escasos para medir tasa relativa de crecimiento en cientos de especies a lo largo de un gradiente de productividad, la medición de las áreas foliares específicas y las densidades específicas de leño de las mismas especies puede constituir un representación útil, aunque menos precisa, de patrones generales de variación en el crecimiento y la productividad vegetal. De manera similar, la elección de caracteres puede ser ligeramente diferente si el factor limitante es mano de obra o acceso a laboratorios de análisis de precisión, o si el proyecto involucra una sola campaña de medición intensiva por especialistas bien entrenados o si las mediciones serán realizadas en sucesivos viajes de campo por ayudantes no especializados. Las recetas que aquí brindamos, incluyendo los comentarios de la sección *Casos especiales o extras*, deberían ayudar a tomar la decisión sobre qué caracteres medir.

por ejemplo la inclusión de representantes de distintos clados. En este último caso podría ser poco relevante la abundancia local de las especies. En cambio, si se intenta comprender cómo las variables ambientales estructuran las características de la vegetación, o cómo las características de la vegetación afectan los flujos locales de materia y energía (por ejemplo la productividad primaria y secundaria o el reciclado de carbono, agua o nutrientes), el criterio principal para la selección de especies debería ser su abundancia local. En esos últimos casos, se recomienda seleccionar las especies de manera de alcanzar aproximadamente el 80% de la abundancia relativa acumulada (ver Garnier *et al.* 2004, Pakeman and Quested 2007; abajo se brindan más especificaciones sobre medidas de abundancia). En comunidades con riqueza particularmente alta por unidad de área, si ésta está además combinada con alta equitatividad, se pueden hacer excepciones a este criterio, ya que la aplicación del mismo sería operativamente impracticable. Un ejemplo de este tipo de comunidades son las selvas tropicales y los fynbos del Sur de África, en los cuales en algunos casos para alcanzar el umbral del 80% de la biomasa deberían medirse más de 100 especies.

Cuando la vegetación es predominantemente leñosa, es recomendable incluir las especies más abundantes del sotobosque aún si su biomasa es mucho menor que la de las especies del dosel (en particular cuando se intenta averiguar las respuestas o efectos de toda la comunidad o cuando el análisis es a nivel ecosistémico). En comunidades herbáceas, la contribución de distintas especies puede variar de manera estacional. Debido a esto, como primer paso, sugerimos que la abundancia relativa de las especies, así como los caracteres, sean medidos durante el pico de la estación de crecimiento de cada comunidad. Debe tenerse en cuenta que esto no siempre aplica a las estructuras reproductivas, las cuales deben ser medidas cuando están presentes y totalmente desarrolladas, aunque esto no coincida con la etapa de máximo crecimiento vegetativo.

Por su parte, si las preguntas de interés apuntan a la comparación entre distintas comunidades o al monitoreo de tendencias en propiedades ecosistémicas a lo largo de gradientes ambientales (por ejemplo gradientes de contaminación, clima o fertilidad del suelo), las especies deberían ser seleccionadas en función de la sensibilidad de sus atributos al factor de interés. En este caso también debería ser considerada la importancia local y regional de la especie, así como la factibilidad de encontrarlas e identificarlas en el campo (independientemente de su abundancia relativa) (Ansquer *et al.* 2009; De Bello *et al.* 2011). En este sentido puede ser útil distinguir entre caracteres que son más ‘variables’ y otros que son más ‘estables’ (Garnier *et al.* 2007). A pesar de que la mayoría de los caracteres presentan algo de variabilidad intraespecífica a lo largo de gradientes ambientales, la variación de los llamados ‘caracteres estables’ es baja, comparada con su variación interespecífica. Lo

opuesto ocurre con los llamados ‘caracteres variables’. Esto implica que los caracteres variables deberían medirse en más de un sitio o condición a lo largo del gradiente estudiado (Garnier *et al.* 2007). Entre los caracteres variables se encuentra la altura vegetativa y reproductiva de la planta, el contenido de nutrientes en las hojas, el periodo de floración, la arquitectura de la planta y la espinosidad. Dentro de los caracteres considerados relativamente estables se encuentran los caracteres categóricos como forma de vida, capacidad de formar clones, modo de dispersión y polinización, y, en menor grado, tipo de vía fotosintética (C_3 o C_4). Algunos caracteres cuantitativos, como contenido de materia seca de hoja o de rama, o dureza de hoja pueden ser ‘estables’ a lo largo de ciertos gradientes, por ejemplo de nutrientes o disturbio, pero no a lo largo de otros, por ejemplo gradientes de luz (Poorter *et al.* 2009). En otras palabras, las especies pueden diferir en cuáles son los caracteres cuantitativos más estables a lo largo de un gradiente dado. Debido a eso recomendamos poner a prueba si un carácter es estable o variable antes de definir la forma de considerarlo (Albert *et al.* 2010, 2012; Hulshof y Swenson 2010; Messier *et al.* 2010; Moreira *et al.* 2012).

En el Apéndice 1 presentamos indicadores aproximados de la variabilidad intraespecífica para algunos de los caracteres cuantitativos presentados en este manual (coeficientes de variación, o sea el desvío estándar dividido por la media; a partir de aquí nos referiremos al mismo como CV). También mostramos las unidades de medida usadas más frecuentemente y los rangos de valores que pueden encontrarse en las mediciones. El Apéndice resume información obtenida de datos de campo en estudios realizados en ambientes contrastantes en distintas partes del mundo. Debido al bajo número de réplicas que generalmente se usa, las estimaciones individuales poseen cierta incertidumbre (y el CV suele incrementarse a medida que la escala se incrementa). A pesar de esto, al observar el rango de CV calculado a lo largo de numerosas especies diferentes, se puede obtener una estimación razonable de la variabilidad intraespecífica típica. En el Apéndice 1 presentamos los percentiles 20° y 80° de la distribución del CV.

El modo en que se debe medir la abundancia de las especies para alcanzar el 80% de la abundancia acumulada (por ejemplo si corresponde realizar transectas, seleccionar puntos o cuadrados distribuidos al azar o en forma sistemática) excede el alcance de este manual y además es un tema que se ha cubierto extensamente en diversos manuales de ecología vegetal y ciencias de la vegetación. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que distintos métodos son más apropiados dependiendo de las distintas preguntas ecológicas planteadas (y sus caracteres asociados) (Lavorel *et al.* 2008; ver también Baraloto *et al.* 2010b para bosques tropicales en particular). Una alternativa a la estimación de la abundancia relativa está representada por los enfoques no taxonómicos de medición de caracteres. Estos enfoques permiten capturar

la contribución de las especies más abundantes de manera efectiva. Bajo este enfoque se incluye la medición de caracteres sin tener en cuenta la identidad de la especie, a lo largo de transectas (método ‘transecta de caracteres’, Gaucherand y Lavorel 2007), o alrededor de un punto de muestreo (método ‘caracteres al azar’, adecuado cuando la estructura de la copa es relativamente simple, Lavorel *et al.* 2008). Los métodos no taxonómicos de medición de caracteres han sido utilizados en bosques tropicales, en los cuales las mediciones se basan fundamentalmente en la frecuencia o área basal de los árboles individuales (Baraloto *et al.* 2010b). Debe tenerse en cuenta que los valores de caracteres obtenidos a través de estos métodos pueden diferir de aquellos obtenidos mediante los métodos tradicionales que seleccionan individuos robustos y de ‘aspecto saludable’ para la medición de caracteres (ver Sección 1.2).

1.2 Selección de individuos dentro de las especies

Para realizar comparaciones sólidas entre especies, los caracteres deben ser medidos en individuos adultos, reproductivos y de apariencia saludable, excepto cuando los objetivos particulares del trabajo requieran otro criterio. Para evitar interacción entre los valores de caracteres y los gradientes de luz, sugerimos realizar las mediciones en individuos ubicados en ambientes bien iluminados, preferentemente a plena luz. Esto es particularmente importante para la medición de algunos caracteres de hoja (ver Sección 3.1). Evidentemente este criterio genera problemas para aquellas especies cuyo hábitat es naturalmente umbrío (especies del sotobosque bajo dosel muy cerrado, o especies que se ubican muy cercanas al suelo en pastizales multiestratificados). Para esos casos recomendamos seleccionar las hojas de los ambientes menos sombríos en los que se encuentra la especie (de manera de poder seleccionar hojas que se vean sanas y no descoloridas, ver también Sección 3.1). Además debe evitarse la recolección de individuos severamente afectados por herbívoros o patógenos. Para lograr una mayor consistencia entre las mediciones, recomendamos utilizar el mismo individuo para medir la mayor cantidad de caracteres posibles. La definición de un ‘individuo’ puede ser difícil en el caso de especies con crecimiento clonal (ver Sección 2.5), por lo tanto, la unidad fundamental de medición es en realidad el *ramet*, definido aquí como una unidad reconocible de tallo aéreo con hojas y raíces propias. Este criterio es al mismo tiempo pragmático y con sentido ecológico debido a que, en general, los *genets* son siempre difíciles de identificar en el campo. Además, de cualquier manera, el *ramet* es finalmente la unidad de interés para la mayoría de las preguntas sobre funcionamiento y caracteres. A pesar de esto, debe tenerse en cuenta que seleccionar *ramets* vecinos podría implicar que las muestras no sean biológicamente independientes para un análisis estadístico a nivel de especie. Dentro de una población, los individuos para realizar mediciones de caracteres deben ser seleccionados aleatoriamente o usando

un método sistemático involucrando transectas, cuadrados, etc.

1.3 Réplicas

Los atributos funcionales son a menudo usados de manera comparativa para clasificar las especies en grupos funcionales o analizar la variación intra- e inter-específica de los mismos caracteres. También se los usa para analizar la variación de las características de las especies entre ecosistemas o regiones geográficas. Este tipo de investigaciones implica, casi inevitablemente, un conflicto entre la escala y la precisión de las mediciones. Teniendo en cuenta que cualquier estudio posee restricciones de tiempo y esfuerzo, cuanto mayor sea el número de especies medidas, menor será el número de réplicas que puedan considerarse para cada especie. El número de individuos independientes (réplicas) seleccionado para las mediciones dependerá entonces de la variabilidad natural intraespecífica en el carácter de interés (ver Sección 1.1 donde se discute la variabilidad intraespecífica), así como del número o rango de especies a medir. En el Apéndice 1 indicamos los números de réplicas mínimos y preferidos para diferentes caracteres, sobre la base de la experiencia práctica. Sin embargo, el tamaño muestral más apropiado dependerá de los objetivos y en alcance del estudio. Idealmente, los investigadores deberían evaluar la variación intraespecífica (CV) de los caracteres en los sitios de estudio antes de tomar decisiones sobre los tamaños muestrales. En comparaciones interespecíficas a gran escala es posible tomar un menor número de muestras de cada especie, mientras que en estudios que involucren un número de especies pequeño o un gradiente local, o poco pronunciado, puede ser necesario realizar un muestreo más intensivo de cada especie. Recomendamos fuertemente cuantificar la contribución relativa de la variación intra e interespecífica. Para hacer esto, se pueden usar análisis formales de potencia estadística sobre la base de una varianza establecida o conocida entre individuos comparada con la varianza entre especies. Muchos paquetes estadísticos incluyen rutinas para realizar análisis de potencia, así como para analizar los componentes de la varianza (usados normalmente para hacer particiones de la varianza a nivel de especies vs. individuos). Los modelos mixtos constituyen otro grupo de técnicas estadísticas, más potentes y complejas, para realizar análisis similares (Albert *et al.* 2010; Messier *et al.* 2010; Moreira *et al.* 2012).

2 Caracteres de planta

2.1 Historia de vida y longevidad máxima

La longevidad de las plantas (generalmente medida en años) se define como el período de tiempo desde su establecimiento hasta que no quedan partes vivas de ese

individuo, determinado por características intrínsecas de la planta, aunque las condiciones ambientales sean favorables. Por ejemplo, aunque las condiciones ambientales favorables para la supervivencia persistan por décadas o aún siglos, una planta anual morirá luego de una temporada de crecimiento y reproducción, algunas plantas perennes vivirán algunas décadas y otras continuarán creciendo luego de un par de siglos. Si bien la longevidad máxima es intrínseca, el predominio de plantas de longevidad corta o larga da indicios del régimen climático, de disturbio y de uso de la tierra de un lugar.

La longevidad en las plantas no clonales es limitada, pero podría considerarse casi ilimitada en las plantas clonales. La longevidad máxima está fuerte y positivamente asociada con los regímenes de estrés ambiental, por ejemplo bajas temperaturas y baja disponibilidad de nutrientes, que retardan el crecimiento. Por el contrario, la relación con la frecuencia de disturbios es generalmente negativa, aunque las plantas clonales longevas (rebrotadoras) podrían tolerar también disturbios frecuentes.

Se considera que podría haber un compromiso entre la longevidad máxima y la dispersión en el tiempo y en el espacio. A menudo, las especies más longevas poseen bancos de semillas de corta duración y producen semillas o frutos con bajo potencial de dispersión. En contraste, las especies efímeras a menudo poseen bancos de semillas muy persistentes y/o alto potencial de dispersión.

¿Cómo realizar las mediciones?

(A) Historia de vida

Esta clasificación distingue los tipos más comunes de momento de ocurrencia y de duración del comportamiento reproductivo de plantas individuales en ausencia de disturbios o catástrofes.

- I. *Anual*: la planta envejece y muere luego de la primera estación de crecimiento (desde semilla), luego de producir semillas, las que podrán propagar una nueva planta en el futuro (una planta anual de invierno germinará al final del verano o en otoño, entonces tiene dos temporadas, aunque la primera podría ser muy corta).
- II. *Bianual*: hay crecimiento vegetativo durante la primera temporada; en la segunda temporada producen flores y semillas, seguidas por la senescencia y muerte del tallo y del sistema radical.
- III. *Perenne*: el individuo sobrevive por al menos tres estaciones de crecimiento.
 - a. *Perennes monocárpicas*: Luego de varias a muchas estaciones de crecimiento vegetativo, la planta produce semillas, para luego envejecer y morir.

b. *Perennes policárpicas*. El tallo completo, o buena parte de él y el sistema radical, sobreviven al período desfavorable o de dormición entre dos estaciones de crecimiento; a lo largo de los años, los tallos tienen engrosamiento lateral.

1. *Perennes herbáceas*: tallos aéreos (y algunas veces raíces) mueren cuando termina la estación de crecimiento; en la siguiente estación nuevos tallos crecen desde un órgano vegetativo (pueden ser bulbos, cormos, rizomas o la corona de la raíz (base del tallo con yemas, o hemicriptófitas) cerca o debajo de la superficie del suelo.
2. *Perennes leñosas*: de una estación de crecimiento a la otra conservan vivas algunas ramas portadoras de hojas, las cuales mueren al final de su tercera estación de crecimiento o posteriormente a ésta.

Distinción cualitativa entre las categorías de historia de vida

Toda planta que posea algún órgano que persiste la estación desfavorable distinto de las semillas se considera siempre perenne o bianual (en este último caso sólo a través de una raíz principal reservante). Si la planta es bianual, debería haber individuos con raíces reservantes y sin inflorescencias, y otros con ambas. Una planta que carece de órganos de persistencia especializados puede aun ser perenne a través del rebrote desde la corona de la raíz. Si esto sucede, la corona normalmente poseerá marcas o cicatrices de las yemas de anteriores estaciones y puede, eventualmente, volverse bastante gruesa e incluso leñosa (un caudex o lignotubérculo). En contraste, la raíz de una planta anual es relativamente blanda y flexible y mantiene su espesor en la transición hacia el tallo. Una planta perenne en su primer año de crecimiento se asemeja a una anual en esos aspectos, excepto porque las plantas perennes salvajes generalmente no florecen en su primer año, mientras que las anuales lo hacen siempre (aunque muchas perennes de interés hortícola han sido seleccionadas para florecer en su primera temporada).

(B) Medición cuantitativa de la longevidad máxima

En gimnospermas y angiospermas, incluso en algunas no leñosas, la longevidad máxima puede ser estimada contando el número de anillos anuales que representan los incrementos anuales del tejido. Recientemente, un estudio basado en 900 especies de herbáceas de zonas templadas reveló la presencia de anillos de crecimiento en las estructuras vegetativas en más del 80 % de esas especies. Sin embargo, la formación de los anillos anuales puede depender de las condiciones del hábitat. Los anillos de crecimiento se encuentran

en la vegetación de zonas con marcada estacionalidad (inviernos fríos o estaciones secas) tales como los polos (boreal o austral), bosques templados e incluso en zonas con clima mediterráneo. En estos últimos dos, los anillos de crecimiento pueden estar ausentes a veces. En algunos casos también pueden encontrarse anillos de crecimiento en especies tropicales, especialmente en regiones con estación seca y húmeda bien diferenciadas. La longevidad máxima dentro de una población se estudia en los individuos más grandes y/o gruesos. Los datos son recolectados de un mínimo de 10 individuos (réplicas), preferentemente 20. En especies leñosas (árboles, arbustos, arbustos enanos) los anillos leñosos se determinan ya sea cortando una sección transversal o una “porción de torta” del tronco principal, o extrayendo una porción con un taladro. Es importante obtener una superficie lisa para poder observarla con claridad. Los anillos de crecimiento se contabilizan observando la muestra en el microscopio.

Amenudo, en individuos con más de un tallo (especialmente en los arbustos, donde los tallos individuales tienen una duración limitada), la sección transversal de uno de sus tallos no representa la edad máxima de manera tan precisa como el cuello de la raíz (zona de transición entre la raíz principal y los tallos). Por esto recomendamos extraer muestras (adicionales) del cuello de la raíz en plantas leñosas. En las especies herbáceas los anillos anuales se encuentran, fundamentalmente, en la base o el cuello de la raíz, pero también en los rizomas. En estos casos, es esencial realizar secciones transversales microscópicas, que deben ser tratadas con “eau de javelle” para remover el citoplasma y posteriormente teñidas (con fucsina, criosidina, astra azul (FCA); alternativamente, astra azul y safranina) para hacer visibles los anillos de crecimiento. En algunos casos se comprobó que la luz polarizada es muy útil para identificar los anillos de crecimiento. La longevidad máxima de una especie o población es definida como el mayor número de anillos de crecimiento contados entre todas las muestras (aunque la longevidad media de todos los individuos podría también ser una información útil).

Casos especiales o extras

- (1) En *plantas clonales*, la identificación de la longevidad (máxima) es más complicada. Si un *ramet* no se independiza del *genet* y nunca es liberado de la planta madre, los anillos de crecimiento de la raíz principal (por ejemplo: *Armeria maritima*; *Sileni acaulis*) o los marcadores morfológicos en el rizoma/estolón (por ejemplo *Lycopodium annotium*, *Dictamnus albus*) pueden ser una herramienta útil para identificar la longevidad máxima del *genet*. En este último caso, la longevidad máxima puede ser mayor si parte del rizoma o estolón está en descomposición. Sin embargo, en plantas clonales donde el *genet* está conformado por

ramets más o menos independientes, la edad del *genet* puede ser estimada sólo indirectamente por medio del tamaño o diámetro de un *genet* en relación a la media del crecimiento en tamaño.

- (2) *Especies geófitas*: especialmente en las monocotiledóneas, puede desaparecer la parte aérea de la planta, incluso por varios años antes de reaparecer. En esos casos sólo parcelas permanentes con individuos marcados pueden dar una idea de la longevidad máxima de esas especies.
- (3) *Arbustos enanos de climas fríos*: en algunas de estas especies, por ejemplo el brezo *Cassiope tetragona*, los anillos de crecimiento laterales son a menudo muy difíciles de identificar, pero los incrementos anuales en el largo del brote de los tallos leñosos se pueden distinguir en el microscopio a través de los septos que los separan y a través de la secuencia anual de las distancias entre las cicatrices de las hojas.
- (4) *Historia de vida y localización*: La historia de vida varía con la localización y preferentemente debería ser evaluada en el campo más que a través de referencias de las floras. En particular, muchas especies de vida corta y crecimiento rápido caen en distintas categorías de historia de vida según la región en la que sean medidas y unas pocas difieren de categoría entre distintos hábitats incluso dentro de una misma región

Referencias sobre teoría y significado: Rabotnov (1950); Schweingruber (1996); Fischer and Stöcklin (1997); Larson (2001); Schweingruber and Poschlod (2005); De Witte and Stöcklin (2010).

Más sobre la metodología: Tamm (1972); Gatsuk *et al.* (1980); Cherubini *et al.* (2003); Rozema *et al.* (2009).

2.2 Forma de vida

La clasificación de formas de vida de Raunkier (1934) es un método simple pero muy práctico para clasificar el tipo de crecimiento de las plantas. Sobre este método se brinda información adicional dentro del Material Suplementario S1.

2.3 Forma de crecimiento

La forma de crecimiento de una planta está fundamentalmente determinada por la dirección y la extensión del crecimiento de dicha planta, y cualquier derivación del eje o ejes del tallo principal. Todo esto afecta la estructura de la copa, incluyendo su altura, así como la distribución vertical y horizontal de las hojas. La forma de crecimiento de una planta puede estar asociada con adaptaciones ecofisiológicas de muchas maneras. Entre ellas se incluye la maximización de la producción fotosintética, el refugio ante condiciones climáticas severas, la optimización de la altura y el posicionamiento del follaje para evitar o resistir el pastoreo por herbívoros específicos (por ejemplo las rosetas y

las formas postradas son las formas de crecimiento más altamente asociadas a la herbivoría por mamíferos).

¿Cómo realizar las mediciones?

La forma de crecimiento es un carácter jerárquico que se mide a través de observaciones en el campo, a través de descripciones o figuras o fotografías provenientes de la literatura. Como en el presente protocolo se clasifican las categorías a lo largo de un continuo, podrían encontrarse, entre las categorías que se reconocen aquí, formas intermedias así como formas ocasionales únicas fuera de cualquiera de las categorías que aquí se describen.

A. *Plantas terrestres, mecánica y nutricionalmente autosuficientes*

I. *Plantas herbáceas*: no tienen crecimiento secundario, o de tenerlo es muy modesto, los tejidos del tallo y raíces son bastante blandos, comparados con la madera típica.

- a. *Plantas en roseta*: hojas concentradas en una sección del tallo corta o rizoma (ver sección 2.5 C por definición de rizoma) sobre, o muy cerca de, la superficie del suelo. Poseen una inflorescencia (o pedúnculo con flor solitaria) con hojas reducidas o sin hojas (brácteas) en el eje de la roseta, por encima del nivel del suelo. Las gramíneas cuyas principales hojas fotosintéticas están unidas a la base de sus tallos aéreos (por ej. “pastos en macolla”) pertenecen a esta categoría.
- b. *Plantas con rizoma alargado con hojas*: el eje permanente es un rizoma alargado; este rizoma directamente lleva las hojas fotosintéticas que se extienden individualmente apuntando hacia la luz. El rizoma puede estar a nivel del suelo o por debajo. (por ej. *Pteridium aquilinum* (helecho), *Viola* spp., *Iris* spp.), o (en epífitas) sobre un soporte sobre el nivel del suelo como una rama de un árbol. Las inflorescencias aéreas (o pedúnculos de flores solitarias), con hojas reducidas (brácteas) o sin hojas, pueden crecer fuera del rizoma.
- c. *Plantas en cojín (forma pulvinada)*: follaje muy apretado cerca de la superficie del suelo, con copa de forma uniforme y redondeada (muchas plantas alpinas tienen esta forma).
- d. *Hierbas con tallos extendidos*: Desarrollan uno o más tallos elongados cuyos nudos llevan hojas fotosintéticas distribuidas casi en toda su extensión (excepto cuando se pierden de la parte más basal de la planta, tardíamente en el crecimiento), pero las hojas están ausentes en las inflorescencias distales. Las gramíneas

(rizomatosas o no) que poseen tallos aéreos con hojas pertenecen a esta categoría.

e. *Gramíneas (o gramínoideas) en macolla*: Desarrollan muchos tallos individuales que pertenecen a una misma colonia densa, o de crecimiento clonal creciendo hacia arriba, desde debajo de una columna de soporte dura (generalmente de tejido muerto), coronada en su parte superior por tallos vivos con hojas activas (por ej. *Eriophorum vaginatum*).

II. *Plantas semileñosas*: tallo sin crecimiento secundario, pero a menudo endurecido por esclerificación (o, alternativamente, con un relativamente débil, suave o “anormal” crecimiento secundario).

- a. *Palmoides*: llevan en su ápice una copa con forma de roseta de hojas típicamente grandes, a menudo compuestas, usualmente gruesas (paquicaules), columnares, con tallos poco o nada ramificados (por ej. Palmeras, *Pandanus*, helechos arborescentes). Algunas Astereaceae tropicales alpinas como *Espeletia* spp, Cicadáceas, Dracaena, especies arborescentes de *Yucca*, y algunas Bombacaceae pueden considerarse como pertenecientes a esta forma de crecimiento, aunque sus tallos tienen crecimiento secundario más extensivo (ver también “Modelo de Corner”).
- b. *Bambusoides*: un tronco sin o con débil crecimiento secundario, con ramificación excurrente (cfr. A.III.d.1) se endurece por esclerificación para soportar una copa, a menudo del tamaño de un árbol, extendida verticalmente (bambus; varias dicotiledóneas herbáceas altas, como *Chenopodium*, *Amaranthus* y *Helianthus*).
- c. *Suculentas de tallo*: poseen un tallo fotosintético generalmente áfilo, con un extenso tejido blando almacenador de agua, y con limitado crecimiento secundario (Cactus, plantas cactoides pertenecientes a otras familias, tener en cuenta que la mayoría de las suculentas con hojas pertenecen a alguna de las subclases de A.I o A.III).

III. *Plantas leñosas*: desarrollan Xilema secundario y floema del cambium vascular extenso usualmente duro, y una corteza externa suberosa a partir del cambium suberoso (las enredaderas serán tratadas en B.III de la presente sección).

a. *Subarbustos postrados*: Tallos leñosos persistentes, con crecimiento horizontal al

- nivel del suelo (por ej. muchos sauces del Ártico y ericoides).
- b. *Arbustos enanos o subarbustos*: usualmente poseen múltiples tallos leñosos ascendentes de menos de 0,5 m de alto.
 - c. *Arbustos*: plantas leñosas de entre 0,5 m y alrededor de 5 m de alto; típicamente la copa es sostenida por varios troncos que emergen del suelo, que son usualmente más delgados que los troncos maduros de un árbol.
 - d. *Árbol*: planta leñosa, generalmente de más de 5 m de alto, con la mayor parte de su copa sostenida por un único tronco en el punto de emergencia del suelo.
 1. Excurrente: eje principal solitario (tronco) se extiende hasta, o casi hasta, el extremo superior de la copa, con ramas más cortas ascendentes u horizontales que le dan una forma cónica o (en árboles maduros) forma columnar a la copa.
 2. Delicuescente: El tronco se divide, sobre su base, en dos o muchas ramas, más o menos iguales, que se continúan ramificando hacia arriba para producir una copa más expandida y más aplanada.
 - e. *Árbol enano*: su morfología es como los tipos 1 y 2 mencionados anteriormente, pero son sustancialmente más bajos de 5 m. Incluye muchos árboles del sotobosque en las selvas, pero también en diferentes hábitats poco favorables desde el punto de vista climático o nutricional, en hábitats con gran insolación o semi desiertos, algunas selvas tropicales nubladas, pantanos y cerca de la línea de árboles.
- B. *Plantas mantenidas estructural o nutricionalmente por otras plantas o por estructuras físicas especiales*.
- I. *Epífitas*. Plantas que crecen unidas al tronco o ramas de un arbusto o árbol (o a soportes antropogénicos) por raíces aéreas, normalmente sin contacto con el suelo (por ej. muchas orquídeas tropicales y Bromeliaceae).
 - II. *Litófitas*: plantas que crecen dentro o sobre las rocas (por ej. muchas especies de helechos, especies de *Nepenthes*, *Utricularia forestii*, *Cymbalaria muralis*).
 - III. *Trepadoras o enredaderas*: plantas cuyas raíces están en el suelo pero se apoyan, al menos inicialmente, en un soporte externo para su crecimiento hacia arriba y para el posicionamiento de las hojas.
 - a. *Enredaderas herbáceas*: usualmente unidas a su soporte por ser la planta voluble (la planta trepadora se enrosca mediante vueltas al tallo de la planta soporte o por medio de zarcillos).
 - b. *Enredaderas leñosas, incluyendo lianas*: a menudo unidas a un soporte por medio de raíces aéreas.
 - c. *Trepadoras leñosas*: crecen sin ningún medio de adhesión a través de las copas suficientemente densa de otras plantas (por ej. *Galium* spp).
 - d. *Estranguladoras*: Puede comenzar su crecimiento como una epífita (pero luego se arraiga en el suelo), o pueden trepar desde el nivel del suelo. Sin embargo, , luego por crecimiento secundario se vuelven autónomas, y eventualmente pueden rodear el tallo que inicialmente las sostenía (por ej. ciertas especies tropicales de *Ficus*)
 - IV. *Hidrófilas sumergidas o flotantes*: plantas herbáceas, acuáticas que dependen del agua circundante como soporte físico. (Hidrófilas emergentes (“helofitas”) en general pertenecen a alguno de los subgrupos de A.I.)
 - V. *Parásitas/saprófitas*: obtienen una importante proporción de sus necesidades nutricionales directa o indirectamente de otras plantas vasculares (parásitas) o de materia orgánica muerta en el suelo (saprófitas) (ver Material Suplementario 2: Absorción de nutrientes, donde se describen otras formas más específicas de parasitismo).
- Referencias sobre la teoría, significado y bases de datos*: Cain (1950); Ellenberg and Müller-Doobois (1967); Whittaker (1975); Barkman (1988) y referencias los textos; Rundel (1991); Richter (1992); Box (1996); Ewel and Bigelow (1996); Cramer (1997); Lüttge (1997); Medina (1999); McIntyre and Lavorel (2001).
- Más bibliografía sobre métodos*: Barkman (1988) y referencias en el texto.
- ### 2.4 Altura de la planta
- La altura de una planta es la distancia más corta entre el límite más alto de los tejidos fotosintéticos principales de esa planta (excluyendo las inflorescencias) y el nivel del suelo, expresado en metros. La altura de una planta, o altura máxima (H_{\max} por su sigla en inglés), es la máxima estatura de un individuo maduro típico que una especie logra en un hábitat determinado. La H_{\max} está asociada con la forma de crecimiento, la posición de la especie en el gradiente vertical de luz de la vegetación, el vigor competitivo, el tamaño reproductivo, la fecundidad de la planta, la longevidad promedio y si la especie es capaz de establecerse y alcanzar un tamaño reproductivo entre dos eventos de disturbio (fuego, tormenta, arado, pastoreo, etc).

¿Qué medir y cómo realizar las mediciones?

Se recomienda realizar las mediciones sobre plantas saludables con su follaje completamente expuesto a la luz del sol (o al menos, plantas con la mayor exposición a la luz que la especie experimente). Como la altura de la planta es bastante variable, tanto dentro como entre especies, hay tres formas de estimar H_{\max} , dependiendo del tamaño de las especies, del número de plantas y del tiempo disponible:

- 1) para especies bajas, las mediciones son tomadas preferentemente en al menos 25 individuos maduros por especie;
- 2) para árboles altos, en los cuales la medición de la altura consume mucho tiempo, se suelen tomar medidas en los cinco individuos más altos encontrados;
- 3) para árboles en general, y si se dispone de tiempo recomendamos medir unos 25 individuos que cubran el rango completo de sus alturas y diámetros. Luego se usa una regresión asintótica para relacionar la altura con el diámetro y derivar la asíntota de los coeficientes de regresión, o se usa la fórmula para calcular el alto del individuo en pie más grueso.

La altura a medir es la altura del follaje de las especies, no el alto de la inflorescencia (o semillas, frutos), ni el tallo principal si éste se proyecta sobre el follaje. Para especies herbáceas es preferible hacer las mediciones al final de la estación de crecimiento. La altura registrada debería corresponder a la parte más alta de la copa general de la planta, descontando cualquier rama excepcional, hojas o porciones fotosintéticas de la inflorescencia.

Algunas opciones para estimar la altura de los árboles altos son:

1. Una vara telescópica con los decímetros marcados.
2. Métodos trigonométricos tales como la medición de la distancia horizontal del árbol al punto de observación (d) y- con un clinómetro o laser- el ángulo entre el plano horizontal y la cima del árbol (α) y entre el plano horizontal y la base del árbol (β). La altura del árbol (A) se calcula como: $A = d \times [\tan(\alpha) + \tan(\beta)]$. La altura estimada es más precisa si el ángulo medido es entre 30 grados (es más fácil de definir el punto más alto de la copa) y 45 grados (un error más pequeño en la altura, a causa de imprecisiones en las lecturas). La distancia horizontal entre el observador y el tallo debería ser, preferentemente, igual a 1 a 1,5 veces la altura del árbol.

Casos especiales o extras

- (1) *Rosetas*. Para plantas con la mayoría de sus hojas dispuestas en forma de roseta, en relación a otros tejidos

fotosintéticos a mayor altura, la altura de la planta debe tomarse como aquella de las hojas en roseta.

- (2) *Herbáceas*. Para especies herbáceas medir la altura de la parte vegetativa de la planta podría ser engañoso (por ejemplo si la planta se curva hacia abajo, o si la inflorescencia tiene porciones fotosintéticas significantes). En este tipo de plantas, la medición de la altura de la parte reproductiva de la planta puede ser 'más segura'. Adicionalmente, algunos autores sugirieron que la proyección de una inflorescencia por encima de la parte vegetativa de la planta podría ser un carácter útil de respuesta al disturbio. Con ese criterio puede ser de utilidad medir ambas alturas. Otros autores, registran la máxima altura de la copa, y usan arbitrariamente el largo de la hoja que mide dos tercios de la hoja más larga como tope para estimar la posición de la transición entre crecimiento vegetativo y reproductivo.
- (3) *Epífitas*. Para las epífitas y algunas hemiparásitas (aquellas que penetran las ramas de un árbol o arbusto con sus haustorios), la altura es definida como la distancia más corta entre el límite superior del follaje y el centro de su punto basal (donde se une a la planta que la soporta).
- (4) *Copas grandes y expandidas*. Para árboles con copas grandes y expandidas es difícil estimar la altura sobre el tallo. Para tales individuos es más fácil medir (con un distanciómetro óptico o laser) la altura vertical, como la distancia desde el ojo hasta la ubicación del margen de la copa (que está a nivel con la cima del árbol). Luego se multiplica ese valor por el seno del ángulo observado a la horizontal (medido con un clinómetro); y por último se suma la altura vertical desde el nivel del ojo hacia la base del árbol (si el nivel del ojo está por debajo del nivel de la base del árbol esta última operación es una resta).
- (5) *Crecimiento denso*. Para tipos de vegetación con un crecimiento tan denso que hace difícil la medición de la H_{\max} , hay versiones modificadas de la ecuación anterior. Estas versiones incluyen el uso de una vara de altura conocida que se debe ubicar verticalmente en la base del árbol.

Referencias sobre teoría, significado y bases de datos:

Gaudet and Keddy (1988); Niklas (1994); Hirose and Werger (1995); Thomas (1996); Westoby (1998); Kohyama *et al.* (2003); King *et al.* (2006); Poorter *et al.* (2006, 2008); Moles *et al.* (2009).

Más bibliografía sobre métodos: Korning and Thomsen (1994); Thomas (1996); Westoby (1998); McIntyre *et al.* (1999); Weiher *et al.* (1999).

2.5 Clonalidad, banco de yemas y órganos de almacenamiento subterráneos

La clonalidad es la capacidad de una especie de reproducirse o regenerarse vegetativamente, produciendo nuevos *ramets* (unidades encima del nivel del suelo) y que luego se expanden horizontalmente. La clonalidad puede dar a las plantas vigor competitivo y la habilidad de explotar parches ricos en recursos clave (por ej. nutrientes, agua, luz). El comportamiento clonal puede ser una estrategia efectiva para migrar cortas distancias bajo circunstancias de baja dispersión de semillas o bajo reclutamiento de plántulas. La clonalidad también le da a una planta la habilidad de formar un banco de yemas que puede ser determinante para la recuperación y persistencia después de disturbios ambientales. El banco de yemas consiste en todas las yemas axilares y adventicias viables que están presentes en una planta y están disponibles para la ramificación, y que pueden reemplazar tallos, rebrotar después de estaciones severas (invierno, estación seca, temporada de incendios) o regenerarse vegetativamente después de un daño (las yemas adventicias que surgen después del daño, aunque son un medio importante de regeneración en algunas plantas, suelen ser excluidas del concepto de banco de yemas). Tanto las características del banco de yemas, como el tipo de crecimiento clonal exhibido por las plantas, determina su habilidad de recuperarse de los disturbios (ver Material Suplementario 3 por el protocolo para Caracterización del banco de yemas, basado en Klimeš y Klimešova 2005). Los órganos clonales, especialmente aquéllos bajo el nivel del suelo, pueden servir como órganos de almacenamiento y como órganos vegetativos: a menudo es imposible hacer una marcada distinción entre estas funciones.

¿Cómo recolectar y cómo clasificar?

Para determinar estructuras clonales sobre el nivel del suelo, observar un mínimo de cinco plantas que estén lo suficientemente separadas entre ellas como para disminuir la probabilidad de que estén interconectadas; las plantas tienen que estar bien desarrolladas. Para determinar estructuras subterráneas, cavar un mínimo de cinco plantas saludables (Apéndice 1). En algunos casos (por ej. sistemas radicales grandes y pesados) la excavación parcial puede dar una evidencia suficiente para la clasificación. El mejor momento para medir clonalidad y bancos de yemas es cerca del final de la estación de crecimiento. Se debe remover el suelo y las partes muertas de las plantas antes de contar las yemas o clasificar los órganos. Una especie se considera clonal cuando al menos una planta tiene claramente uno de los órganos clonales listados abajo (ver las Referencias más abajo para la discusión). Las categorías son:

A. Órganos clonales ausentes.

B. Órganos clonales presentes sobre el nivel del suelo:

1. *Estolones*: tallos horizontales, a menudo hiperlargados, cuyas yemas axilares producen raíces nodales y, como resultado, plantas que pueden independizarse (por ej. frutilla *Fragaria vesca* y *Saxifraga flagellaris*).
 2. *Bulbillos*: pequeños bulbos radicales producidos de yemas axilares o yemas florales, o por yemas adventicias que crecen sobre las hojas (por ej., *Cardamine pratensis*, *Bryophyllum*). Propágulos vegetativos análogos son llamadas “gemmae” en las briófitas.
 3. *Fragmentación* del cuerpo vegetativo de la planta (sobre todo en plantas acuáticas y briófitas).
- C. Órganos clonales subterráneos:
1. *Rizomas*: tallos subterráneos más o menos horizontales que usualmente llevan hojas escamosas no fotosintéticas (por ej. muchos pastos y juncos), aunque a veces tienen hojas fotosintéticas que emergen sobre el suelo (por ej. *Iris*, *Viola*, *Pteridium*). Los tallos aéreos, vegetativos o reproductivos crecen desde las yemas axilares (o en algunos casos de las yemas terminales) del rizoma. La mayoría de los rizomas pueden ramificarse, después de lo cual declinan y se deterioran desde la porción proximal hasta el punto de ramificación, así el clon se independiza generando luego nuevos individuos, clonalmente.
 2. *Tubérculos y turiones*: tallos o rizomas subterráneos conspicuamente engrosados que funcionan como órganos de almacenamiento de carbohidratos y llevan yemas axilares; éstas pueden propagar la planta (por ej. *Solanum tuberosum*, *Helianthus tuberosus*). Los turiones son órganos similares a los tubérculos que se forman en plantas acuáticas.
 3. *Bulbos*: tallos subterráneos relativamente cortos, que llevan hojas escamosas y carnosas, anidadas concéntricamente y que actúan como órganos de reserva; sirviendo toda esta estructura globosa para perpetuar la planta y, a través del crecimiento de yemas axilares dentro del bulbo que se transforman en bulbos hijos, para multiplicar la planta vegetativamente. (por ej. tulipán *Tulipa*, cebolla *Allium*).
 4. *Cormos*: tallos subterráneos engrosados globosos, orientados verticalmente que pueden llevar hojas escamosas o comunes; las yemas axilares o terminales sobre el cormo sirven para perpetuar la planta y, en menor medida, para reproducción clonal (por ej. *Dahlia*).
 5. *Raíces tuberosas*: raíces engrosadas que sirven primariamente para almacenamiento pero pueden formar yemas adventicias que permiten propagación clonal (por. ej. *Ipomoea batatas*).

6. *Retoño o serpollo*: son raíces que se desarrollaron de las yemas adventicias, producidas sobre raíces ordinarias no almacenantes (por ej. *Aspen*, Álamo *Populus tremuloides*, ciruela salvaje *Prunus* spp).
7. *Lignotubérculo*: una expansión leñosa, masiva justo debajo de la superficie del suelo, producida por crecimiento secundario de la corona de la raíz en muchos arbustos en zonas de vegetación propensa al fuego. Después de un fuego que mata la copa aérea del arbusto, crecen yemas adventicias sobre el lignotubérculo que regeneran la copa del arbusto (ver Sección 6.6); generalmente, esto no resulta en multiplicación clonal.
8. *Estratificación*: los tallos vegetativos comunes que yacen o caen sobre el suelo, allí producen raíces adventicias y continúan el crecimiento apical, convirtiéndose en plantas independientes cuando su conexión con la planta madre es cortado (por ej. zarzamora y frutilla (*Rubus*), algunas spp. de abeto (*Picea*) y cicutilla (*Tsuga*)).

Si una especie tiene crecimiento clonal (categorías B o C, ver arriba), el mismo se clasifica de acuerdo a una o más de las siguientes categorías:

- (1) Crecimiento clonal *regenerativo*: es el que ocurre después de un daño y normalmente no se multiplica el número de individuos, como sucede en el rebrote desde un lignotubérculo.
- (2) Crecimiento clonal *aditivo* (también llamado multiplicativo): puede ser tanto la forma normal de multiplicación de la planta como inducido por condiciones ambientales, tales como alta disponibilidad de nutrientes; y sirve para promover la dispersión de la planta.
- (3) Crecimiento clonal *necesario*: es necesario para la supervivencia de la planta de un año a otro, como muchas plantas que crecen vegetativamente desde rizomas, bulbos, tubérculos o raíces tuberosas y no tienen, o de tenerlo es escasa, reproducción por semillas. El crecimiento clonal puede satisfacer una o más de estas funciones, y en ese caso puede no ser posible distinguir entre ellas. En algunos casos la naturaleza funcional del crecimiento clonal puede ser simplemente:
- (4) *Desconocida* o no evidente, en cuyo caso puede ser registrada como tal.

Referencias sobre la teoría, significado y bases de datos: De Kroon and Van Groenendael (1997); Klimeš *et al.* (1997); Van Groenendael *et al.* (1997); Klimeš and Klimešova (2000, 2005); Knevel *et al.* (2003); Klimešova and Klimeš (2007).

Más bibliografía sobre métodos: Böhm (1979); Klimeš *et al.* (1997); Van Groenendael *et al.* (1997); Weiher *et al.* (1998); Klimeš and Klimešova (2005).

2.6 Espinosidad

La espinosidad se refiere al grado en que la planta está defendida por espinas foliares, espinas caulinares y/o aguijones. Las espinas foliares son hojas, partes de hojas o estípulas modificadas endurecidas y puntiagudas; también ocurren algunas veces en los frutos. Las espinas caulinares son ramas modificadas. Los aguijones se originan a partir de la epidermis o la corteza (p. ej. los aguijones de los tallos de las rosas). Debido a que la espinosidad está claramente involucrada en la defensa contra herbívoros, especialmente contra herbívoros vertebrados, hay dos aspectos críticos a tener en cuenta: (1) la efectividad de la defensa física para prevenir o mitigar el daño por herbívoros; y (2) el costo para la planta de producir estas defensas. Diferentes tipos, tamaños, ángulos y densidades de espinas y aguijones pueden actuar como defensa contra diferentes herbívoros. Aunque en muchos la caracterización de la espinosidad a través de la medición de las espinas es suficiente, algunos investigadores podrían decidir que son necesarios experimentos con herbívoros reales. De esta manera, se puede examinar la efectividad de las defensas antiherbívoros, p. ej. ofreciendo ramas enteras (con o sin espinas) a diferentes animales y registrando cuánta biomasa es consumida por unidad de tiempo (ver Casos especiales y extras en la Sección 3.16).

Las espinas y aguijones pueden ser una respuesta inducida por la herbivoría, es decir que algunas plantas invierten en estas defensas sólo cuando ya han sido consumidas por herbívoros. Otros tipos de daños, incluyendo poda y fuego, también pueden inducir un aumento de la espinosidad. Además, los caracteres de espinosidad pueden cambiar drásticamente con la edad de la planta o parte de la planta, dependiendo de su susceptibilidad a la herbivoría. Por esta razón la espinosidad algunas veces no puede ser considerada como un carácter innato de la planta, sino más bien como un carácter que refleja la presión de herbivoría real y la inversión de las plantas en defensa. En otras palabras, aunque hay especies que siempre tienen espinas, y especies que nunca las tienen, la espinosidad de una planta individual no es necesariamente representativa del rango potencial de espinosidad de toda la especie (p. ej. algunos miembros de los géneros *Acacia* y *Prosopis* muestran un llamativo rango de longitud de espinas dentro de la misma especie, dependiendo del individuo, la edad y la historia de herbivoría). Las espinas y aguijones pueden jugar a veces un papel adicional en la reducción del calor o el estrés hídrico, especialmente cuando cubren densamente algún órgano de la planta.

¿Cómo medirla?

Las espinas y aguijones –referidas más abajo como ‘espinas’- pueden ser medidas como un carácter cuantitativo o bien como un carácter cualitativo (categórico). Los datos

de espinosidad son preferiblemente medidos en especímenes en el campo, pero también pueden ser recolectados de especímenes de herbario o descripciones en la literatura. La longitud de la espina se mide desde la base de la espina hasta la punta. Si una espina es ramificada, como lo son muchas, su longitud sería hasta la punta de la ramificación más larga. El ancho de la espina, medido en la base de la espina, es a menudo más útil para valorar la efectividad contra herbívoros, y más generalizable entre tipos de espinas. El número de ramas, si es que hay alguna, también debe ser registrado ya que la cantidad y disposición de las ramas pueden incrementar significativamente la efectividad de las espinas contra los herbívoros. La relación entre la longitud de la espina y la longitud de la hoja también puede ser un carácter útil porque da una idea del nivel de protección de la lámina por parte de la espina más cercana a ella.

Fuerza y dureza de la espina. Las espinas son ‘blandas’ si, al estar maduras, pueden ser dobladas fácilmente presionando hacia los lados con el dedo, y ‘duras’ si no pueden ser dobladas de esta forma. La *densidad de espinas* es el número de espinas por unidad de longitud de la ramilla o rama, o área de la hoja. La *asignación de biomasa* de las espinas es también un parámetro importante para algunas preguntas de investigación. Su estimación requiere más trabajo que los parámetros antes descritos, pero es relativamente simple. Corte una porción de longitud estándar de un tallo o rama, corte todas las espinas, seque en horno y pese las hojas, ramas y espinas por separado y estime la asignación fraccional como la relación entre el peso seco de las espinas y el peso seco de las ramas. Estas mediciones cuantitativas de caracteres pueden ser convertidas en estimaciones categóricas de espinosidad utilizando la clasificación propuesta en la Caja 3.

Finalmente, simplemente registrar la presencia o ausencia de espinas es suficiente en algunos casos. Tenga en mente que el tamaño, la estructura y el comportamiento de los herbívoros varía enormemente, así que el grado de protección provisto por la masa de espinas, su tamaño y

distribución puede ser determinado sólo en referencia a un tipo particular de herbívoro. Al seleccionar la medición de espinosidad que tenga más significado, siempre considere qué herbívoros son relevantes.

Referencias sobre teoría, significancia y grandes bases de datos: Milton (1991); Grubb (1992); Cooper and Ginnett (1998); Pisani and Distel (1998); Olff *et al.* (1999); Hanley and Lamont (2002); Rebollo *et al.* (2002); Gowda and Palo (2003); Gowda and Raffaele (2004); Agrawal and Fishbein (2006).

2.7 Arquitectura de la planta

La arquitectura de la planta se refiere a cuán intensamente se ramifica una planta (número de ramificaciones vivas por unidad de longitud de tallo). Las plantas altamente ramificadas pueden estar mejor defendidas contra los herbívoros vertebrados, principalmente haciendo menos eficiente el proceso de alimentación, denegando el acceso de herbívoros a los órganos de la planta, y asegurando que, si los herbívoros llegan a extraer los extremos de los tallos en crecimiento, queden suficientes para que la planta continúe creciendo. Contrariamente, las plantas menos ramificadas pueden estar adaptadas a ambientes donde es necesario crecer en altura rápidamente, como por ej. en sabanas propensas al fuego o un bosque atravesando las primeras etapas de la sucesión secundaria. La arquitectura de la planta también puede tener valor adaptativo en sistemas boscosos, donde las especies de una altura determinada que utilizan baja intensidad de luz tienden a estar más ramificadas que aquellas que utilizan luz de alta intensidad.

Aunque existen métodos complicados y elegantes para evaluar la arquitectura de la planta, una simple caracterización como la que se describe más abajo es a menudo suficiente para entender la significancia adaptativa de este carácter. Al igual que la espinosidad, la arquitectura de la planta es un carácter flexible que puede diferir dentro de una especie dependiendo de la historia de herbivoría, la historia de fuego,

Caja 3

- (1) Sin espinas
- (2) Densidad baja o muy localizada de espinas blandas de menos de 5mm de longitud. La planta puede hacer picar si se la toca sin cuidado, pero no produce dolor fuerte
- (3) Alta densidad de espinas blandas, densidad intermedia de espinas de dureza intermedia, o baja densidad de espinas agudas y duras de más de 5 mm de longitud. La planta produce dolor si se la toca sin cuidado
- (4) Densidad intermedia o alta de espinas agudas y duras de más de 5 mm de longitud. La planta causa fuerte dolor si se la toca sin cuidado
- (5) Densidad intermedia o alta de espinas agudas y duras de más de 20 mm de longitud. La planta puede causar heridas considerables si se la toca sin cuidado
- (6) Densidad intermedia o alta de espinas agudas y duras de más de 100mm de longitud. La planta es peligrosa para mamíferos grandes descuidados, incluyendo los humanos

el acceso a la luz, el vigor o las enfermedades de la planta e incluso el estrés hídrico. La arquitectura de la planta es también variable dependiendo de la edad y la historia de vida de la planta (ver Sección 1.1 para recomendaciones relacionadas con caracteres variables).

¿Cómo medirla?

Para asegurarse que la medición sea sobre una rama que represente de la mejor manera la arquitectura de la planta (una rama que alcanza la parte externa de la copa), realice la medición desde el extremo de una rama terminal que posea hojas hasta alcanzar la primera rama que no tiene hojas en su base, pero que lleva ramas secundarias que sí tienen hojas. La base de esta rama será el punto de partida para medir (1) la longitud total de la rama, que es la distancia desde el punto de partida hasta la punta de la rama terminal más larga y (2) el número de puntos de ramificación que lleven a ramas vivas; desde cada punto de ramificación continuar hacia la punta, siempre siguiendo la rama más importante (la rama principal es a menudo la rama viva más gruesa que sale de un punto de ramificación; ver Fig. 1 para una explicación gráfica). Un indicador de la arquitectura de la ramificación, llamado índice de dominancia apical (IDA; ADI por sus siglas en inglés) se obtiene dividiendo el número de ramificaciones por la longitud total de la rama en metros. El valor de IDA puede variar entre cero (sin ramificaciones) y $>100 \text{ m}^{-1}$ (extremadamente ramificada).

Referencias sobre teoría, significancia y grandes bases de datos: Horn (1971); Pickett and Kempf (1980); Strauss and Agrawal (1999); Enquist (2002); Archibald and Bond (2003); Cooper *et al.* (2003); Staver *et al.* (2011).

Más sobre métodos: Fisher (1986).

2.8 Relación área foliar: área de albura

La cantidad de área de hoja que una especie produce por unidad de leño en un corte transversal (la inversa del valor de Huber, expresado en mm^2/mm^2) es crucial tanto para el transporte de agua (con efectos relacionado sobre la tasa fotosintética) y fuerza mecánica.

Qué y cómo recolectar

La relación área foliar: área de albura (AF:AA) depende en gran medida de la fenología de la hoja. Más aún, hay variación entre las estaciones húmeda y seca, variaciones entre poblaciones de una determinada especie a lo largo de gradientes de humedad, trayectorias ontogénicas de individuos determinados, y en árboles, a lo largo de las ramas desde el tronco hasta el extremo de la misma. La funcionalidad del leño declina con la edad, y esa es una razón por la que AF:AA generalmente aumenta a medida que nos

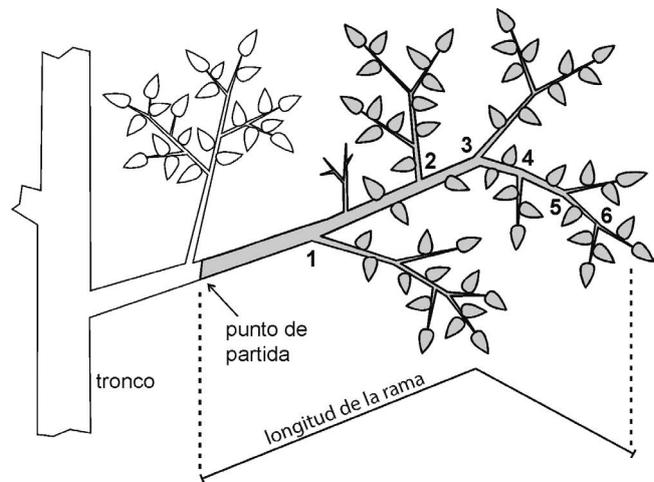


Fig. 1. Medición de arquitectura de la planta. Los números indican los puntos de ramificación que deberán considerarse para el cálculo del índice de dominancia apical (es decir, el número de ramificaciones por metro de rama). Tenga en cuenta que las ramas muertas no son consideradas en el cálculo de este índice.

movemos de ramas más gruesas (más viejas) hacia ramas más pequeñas. Desafortunadamente, la disminución en la función del leño asociada a la edad de la planta no es siempre bien entendida, puede ser difícil de medir, y puede variar entre especies. Todo esto debe ser considerado al diseñar la metodología de muestreo y la interpretación de este carácter (ver *Casos especiales o extras* (iii) más adelante).

Para hacer comparaciones significativas entre especies, recomendamos muestrear tallos terminales, expuestos al sol en la parte más externa de la copa. Esto significa muestrear los tallos terminales, ya sea de un determinado largo estándar o de una determinada edad (1-3 años) (para tallos en los cuales las cicatrices de las yemas terminales permiten determinar la edad). Este abordaje maximiza la posibilidad de que todo el leño de la rama sea aún funcional. Recomendamos el muestreo en el pico de la estación de crecimiento cuando el área foliar, tanto de las hojas individuales como de toda la copa, es máxima. En ese momento, el índice AF:AA debería estar en su máximo del año, esto es similar a los esfuerzos por medir el máximo de tasa fotosintética como forma de hacer comparaciones significativas entre especies. Se debería tener especial cuidado de seleccionar tallos que no hayan perdido hojas o partes de las hojas por daño mecánico, herbivoría o senescencia o abscisión temprana.

Mediciones

La relación área foliar:área de albura puede ser medida a diferentes escalas: desde la planta entera hasta sólo ramas terminales (y esto debería ser considerado cuando se sube

de escala en las mediciones). El área foliar total de las hojas distantes del punto de muestreo es medido mediante el mismo método que el utilizado para hojas individuales (ver Sección 3.2.). El área de albura en el punto de muestreo se mide con más precisión con micrógrafos digitales y programas de análisis de imágenes (ver programas libres en sección 3.1.). Sin embargo, un calibre podría funcionar para la mayoría de las especies en la mayoría de las situaciones. Al medir el área de la albura se debe procurar excluir la corteza, el floema, el duramen y la médula del área medida.

Casos especiales o extras

- (1) Para *especies herbáceas*: se pueden aplicar métodos similares, sin embargo, se debe tener mucho cuidado de identificar las partes del tallo que pueden conducir agua; esta distinción puede no ser tan clara como lo es en la mayoría de las especies leñosas. Para realizar esa distinción se puede realizar un experimento de transporte de tintura (ver punto (iii) más abajo).
- (2) *Cambios estacionales*. El crecimiento del cambium en muchos árboles continúa hasta bastante después de que la explosión de crecimiento de brotes de la primavera se haya completado y el área foliar final para la temporada se haya alcanzado. Debido a esto es mejor medir la relación área foliar:área de albura lo más tarde posible en la estación de crecimiento, cuando todas las hojas recientemente producidas en la estación permanecen unidas a la planta, pero (para las perennifolias) antes de que haya ocurrido la abscisión estacional de las hojas más viejas.
- (3) En *árboles con anillos porosos*: la conductividad efectiva del xilema cae precipitadamente a medida que el leño es más viejo, a veces, inclusive, entre muy pocos anillos de crecimiento. Para estas especies la conductividad del leño (y la declinación con la edad del mismo) puede ser cuantificada al poner la parte terminal del brote en una solución que tiña fuertemente, como por ejemplo eosina, permitiendo de este modo que el follaje transpire. Luego de 10 a 20 minutos, se debe cortar una sección transversal del tallo unos centímetros por encima de la parte terminal y medir el área teñida.

Referencias sobre la teoría, significado y bases de datos: Chiba (1991); Eamus and Prior (2001); Maherali and DeLucia (2001); Mäkelä and Vanninen (2001); McDowell *et al.* (2002); Preston and Ackerly (2003); Addington *et al.* (2006); Buckley and Roberts (2006); Maseda and Fernández (2006); Wright *et al.* (2006); Cornwell *et al.* (2007); Litton *et al.* (2007).

Referencias en metaanálisis: Mencuccini (2003).

2.9 Proporción de biomasa invertida en raíces

La teoría predice que las plantas de sitios pobres en nutrientes podrían asignar una fracción mayor de la biomasa nueva a las raíces y mantener una distribución proporcionalmente más alta de biomasa en raíces que en tallos. La distribución de la biomasa de raíces puede ser expresada simplemente como la fracción raíz/ masa (FRM, sinónimo de índice de raíz- masa, IRM), se calcula del mismo modo que la proporción de materia seca en raíces. Debe tenerse en cuenta que medir asignación de biomasa a raíces propiamente dicha requiere cuantificar las tasas de recambio y la distribución de la biomasa en pie; esto es un trabajo muy intenso que rara vez se lleva a cabo. Pese a esto, asignación y distribución de biomasa son a menudo utilizados como sinónimos e, independientemente de si este criterio es apropiado o no, en este trabajo seguiremos esta convención. Nosotros preferimos la FRM al índice de raíz/ tallo (IRT) que se usa frecuentemente, porque FMR tiene un rango de 0 a 1 y puede ser interpretado y comparado más fácilmente, mientras que IRT puede variar desde números muy pequeños hasta números muy altos. Es notable como la asignación a raíces puede ser altamente plástica a lo largo de gradientes de suministro de luz, nutrientes y agua. Algunos patrones pueden ser aparentemente contradictorios; esto se debe a que la asignación a raíces puede permitir mayor eficiencia en conseguir nutrientes subterráneos (lo cual sería una ventaja, especialmente cuando los recursos son escasos) pero también una mayor competencia debajo del suelo cuando los recursos son abundantes. En revisiones sobre casos experimentales, incluyendo aquéllos que toman aproximaciones alométricas, FRM típicamente baja con el incremento de la disponibilidad de nitrógeno. Sin embargo, otros estudios reportaron que en el campo, las especies de rápido crecimiento adaptadas a hábitats ricos en nutrientes mostraron mayor asignación a las raíces que las especies de crecimiento lento de sitios pobres en nutrientes. De manera similar, plántulas con respuestas plásticas a baja intensidad de luz típicamente disminuyen su FRM, mientras que plantas adaptadas a crecer en lugares sombríos en las selvas de lluvia suelen tener altas FRM, aparentemente para sobrevivir periodos de bajo suministro de agua y nutrientes en competencia con los árboles circundantes. Notar que algunos reportes de diferencias en FRM a lo largo del gradiente de recursos son potencialmente confundidos con fallas en el recuento de la alometría y tamaño (ver Referencias sobre la teoría, significado y bases de datos más adelante). Además, la FRM no se traduce directamente en alta tasa de absorción de recursos del suelo. La menor asignación a raíces podría ser compensada por mayores longitudes específicas de las raíces (Ver 5.1) y por una mayor absorción en relación a la asignación al largo, área superficial o masa de raíces.

La FRM puede ser usada para propósitos comparativos si es medida para plantas de masa similar. Alternativamente, si se cosechan plantas dentro de un rango de masa, las relaciones alométricas pueden ser usadas para estimar la FRM para plantas de un tamaño dado.

Se debe tener mucho cuidado de cosechar todas las raíces (ver 5), a pesar de la dificultad de separar las raíces del suelo, particularmente las raíces finas. Sin embargo, en estudios en campo, a veces FRM sólo incluye un subset de todos los tejidos subterráneos, en ese caso el investigador debe ser claro sobre qué está incluido y que no.

Casos especiales o extras

- (1) *Órganos de almacenamiento y fraccionamiento de raíces*: La FRM debería incluir, en teoría, todo el desarrollo de la planta (y por este mismo motivo ¡no debe incluir micorrizas!) Sin embargo, estudios particulares pueden subdividir fracciones específicas para propósitos específicos (por ej. raíces finas, raíces gruesas, coronas, rizomas (para pastos), raíz principal (en árboles)), para evaluar las proporciones relativas para cada uno en relación a cada uno de los otros y/o en relación a la biomasa subterránea.

Referencias sobre la teoría, significado y bases de datos: Evans (1972); Grime (1979); Aerts *et al.* (1991); Elberse and Berendse (1993); Veneklaas and Poorter (1998); Aerts and Chapin (2000); Reich (2002); Sack *et al.* (2003); Poorter *et al.* (2012).

2.10 Resistencia a la salinidad

Muchas áreas del mundo, incluyendo zonas costeras, zonas con suelos pobremente drenados en climas áridos o con sistemas de irrigación mal diseñados, muestran altas concentraciones de sal en el suelo (>100-200 mM NaCl). Sólo las especies resistentes a la salinidad, que exhiben estrategias para reducir o evitar los efectos dañinos del exceso de sal en sus tejidos, son capaces de mantener poblaciones viables en esas áreas. Las plantas especializadas para habitar en suelos salinos, y a menudo restringidos a ellos, son llamadas *halófitas*.

Entre los miembros de al menos 139 familias de plantas que incluyen halófitas, la evolución muestra múltiples soluciones para enfrentar el exceso de sal en el ambiente, involucrando diferentes caracteres bioquímicos, fisiológicos, estructurales y/o fenológicos. Por eso, más que una simple receta para medir la resistencia a la sal, en esta sección damos un número de caracteres y mediciones que, en conjunto, ayudan a identificar las especies como resistentes a la salinidad, especialmente si esas mediciones están acompañadas por datos sobre la distribución de las mismas especies? en áreas salinas. Sin embargo, clasificar

una especie como sensible a la sal sólo teniendo en cuenta estos caracteres podría ser problemático. Para realizar dicha clasificación son necesarios ensayos experimentales sobre supervivencia de plantas y crecimiento bajo condiciones salinas (lo cual no es tarea sencilla y lleva mucho tiempo, cuando se deben revisar múltiples especies). Los caracteres descriptos a continuación permiten hacer una evaluación cualitativa más que cuantitativa de la resistencia a la salinidad y no permiten la clara separación de plantas más o menos resistentes a la salinidad de las verdaderas halófitas. Esperamos que este texto estimule la investigación hacia enfoques más innovadores y protocolos que puedan probar la resistencia a la salinidad de manera más eficiente y de forma más exhaustiva.

En esta sección hemos simplificado clasificaciones previas de los mecanismos por los que las plantas tratan el exceso de NaCl ambiental, enfocándose en tres estrategias comunes. Algunas especies resistentes a la salinidad pueden limitar la absorción por raíz del Na⁺ potencialmente dañino (“excluidores” de NaCl). Otras especies resistentes a la salinidad, que no pueden evitar significativamente la absorción del NaCl, excretan activamente el exceso de sal o bien acumulan NaCl en vacuolas celulares para impedir la toxicidad para el citosol. Este último grupo (tolerantes a la salinidad) son especies a menudo suculentas, con muchas de las características de las especies tolerantes a la sequía. Muchas especies resistentes a la salinidad poseen mecanismos bioquímicos para reducir el estrés salino o daño en los tejidos, mediante la acumulación de solutos compatibles (incluyendo metabolitos secundarios) en el citosol. Los caracteres de resistencia a la salinidad detallados a continuación se encuadran en las categorías precedentes, excepto adaptaciones bioquímicas especiales que no son tratadas aquí.

Qué medir y cómo hacerlo

Absorción radicular selectiva de cationes: Las raíces de muchas plantas resistentes a la salinidad (particularmente monocotiledóneas) pueden discriminar el Na⁺ mientras mantienen la absorción del elemento esencial K⁺. Esta selectividad de K⁺ por sobre el Na⁺ incrementan la proporción K⁺: Na⁺ en el citosol comparado con la proporción en el medio de las raíces. Como estas proporciones pueden variar con muchos factores ambientales, incluyendo precipitaciones y evapotranspiración, sugerimos realizar el muestreo de hojas y de suelo en al menos tres días diferentes, en intervalos de 2 semanas o más durante la estación de crecimiento; evitar recolectar las hojas antes de 5 días después de lluvias especialmente copiosas o prolongadas. Coleccionar hojas de 5 plantas separadas (Ver Apéndice 1), y muestras de suelo de la principal zona de raíces finas debajo de cada planta. Las concentraciones de Na⁺ y K⁺ de cada muestra deben ser

determinadas en laboratorio por medio de análisis estándar. Los métodos más utilizados y convenientes incluyen la Espectrometría atómica de emisión (EAE), también llamada fotometría de llama, y Espectrometría atómica de absorción (EAA). En general, las muestras foliares deben ser molidas con una parte de agua, y de ese homogeneizado se hace un extracto por filtración. Para el análisis de suelo, se debe agregar agua al suelo seco hasta que se sature de agua, luego extraer el líquido por succión o filtración por vacío. Los análisis de Na⁺ y K⁺ pueden ser realizados en la fase acuosa o luego de la evaporación dependiendo de los métodos de análisis del Na⁺/K⁺ utilizados.

Una vez obtenidos los contenidos de Na⁺ y K⁺ de plantas y de suelos, calcular, para cada planta y su muestra de suelo asociado, la selectividad por K:Na (S) como $S = \frac{([K^+]_{planta})}{([Na^+]_{planta})} / \frac{([K^+]_{suelo})}{([Na^+]_{suelo})}$. Un valor medio de S para una especie se calcula desde la media de todos los valores S de las réplicas por fecha de muestreo tomando el promedio de éstos dividido todas las fechas de muestreo.

Excreción de sal: Las especies excretoras de sal expulsan NaCl a través de glándulas especiales o vesículas, usualmente ubicadas en la cara abaxial de sus órganos fotosintéticos (generalmente hojas, pero en algunos casos tallos). Estas glándulas son a menudo visibles (especialmente bajo lupas de mano) como manchas blancas pequeñas, de forma irregular que en realidad son la sal excretada depositada sobre la superficie de la glándula. El sabor salado de éstas lo confirma. Algunas especies excretan sal por sus raíces. Aunque esto es más difícil de observar, se pueden observar excreciones de sal similares en algunas raíces descubiertas en la toma de muestras de suelo. Debe tenerse en cuenta que las excreciones de sal en raíces y tallos pueden ser lavadas en períodos húmedos, por lo que son mejor observadas luego de un período seco.

Compartimentalización de la sal: La clara succulencia de las hojas o tallos fotosintéticos indica compartimentalización de la sal. Los tallos fotosintéticos suculentos pueden ser tratados y medidos como si fueran hojas (ver *Casos especiales o extras* en 3.1). La succulencia lleva a altos valores de Contenido de agua foliar (CAF) y de Espesor foliar (EF) por lo que la succulencia puede ser cuantificada como el producto de estos parámetros [succulencia (mm) = EF * CAF] (ver 3.3.). Valores > 800-1000 mm indican succulencia significativa.

La succulencia relacionada con la sal es encontrada casi exclusivamente en dicotiledóneas pero ciertas monocotiledóneas tolerantes a la sal pueden ser de alguna manera suculentas, por ejemplo *Elytrigia juncea* en las dunas costeras. Las suculentas tolerantes a la sal muestran un alto nivel de NaCl en sus hojas, lo que las distingue de las suculentas CAM (ver 3.12; algunas suculentas tolerantes a la sal son en realidad también CAM). Esto podría detectarse por el análisis de Na en extracto de las hojas o tallos mencionado arriba, o podría ser revelado muy fácilmente midiendo la

conductividad eléctrica de esos extractos (Ver 3.14 pérdida de electrolitos) que requiere solamente un medidor de conductividad, simple y fácil de conseguir (NaCl en solución produce una conductividad alta). Una evidencia cualitativa de este carácter puede ser una combinación de hojas “jugosas” y un evidente sabor salado cuando se mastica el tejido. Esta propiedad ha hecho a algunas halófitas populares como alimento para los humanos, por ej. *Salicornia* spp.

Casos especiales y extras

- (1) *Suculentas y halófitas.* Muchas suculentas tolerantes a la sal son halófitas y crecen únicamente en ambientes salinos; la expresión de los caracteres anteriormente descritos puede depender de la salinidad real del suelo donde están creciendo. Entonces, sugerimos medir la concentración de sal en el suelo (como describimos en el Apartado Absorción selectiva de cationes radicales, en esta misma Sección) para complementar la medición de caracteres. Muchos otros descriptores de hábitats relacionados con la sal también son relevantes, por ejemplo elevación y duración de la inundación marina diaria (si la hubiera) en pantanos o costas, y la posición relativa a la marca de la marea, visible como resaca, o parches blancos en la superficie del suelo, indicando cristales de sales en las áreas secas.

Referencias sobre la teoría, significado y bases de datos: Flowers *et al.* (1977); Yeo (1983); Rozema *et al.* (1985); Flowers *et al.* (1986); Zhu (2001); Breckle (2002); Munns *et al.* (2002); Vendramini *et al.* (2002); Ashraf and Harris (2004); Flowers and Colmer (2008).

Más sobre metodología: Jennings (1976); Maas and Hoffman (1977); FAO (1999); Breckle (2002); Vendramini *et al.* (2002).

2.11 Tasa de crecimiento relativo y sus componentes

La tasa de crecimiento relativo (TCR) es un indicador importante de la estrategia de la planta con respecto a la productividad y los regímenes de disturbio del ambiente. La TCR es el incremento (exponencial) en tamaño en relación al tamaño de la planta tal como era al principio de un intervalo de tiempo dado. Expresada de esta manera, la tasa de crecimiento puede ser comparada entre especies e individuos que difieren ampliamente en tamaño. Midiendo por separado la masa de hojas, tallos y raíces, junto con el área foliar, se puede obtener, de forma relativamente simple, una buena idea de los componentes subyacentes a estas variaciones en la tasa de crecimiento. Estos componentes subyacentes están relacionados con la asignación de biomasa (fracción de masa foliar, la fracción de la biomasa de la planta asignado a hojas), la morfología foliar (ver 3.1), y la fisiología (Tasa por unidad foliar (TUF), que es la tasa de incremento en

la biomasa de la planta por unidad de área foliar; ésta es una variable íntimamente relacionada con la tasa diaria de fotosíntesis por unidad de área foliar; también conocido como Tasa de asimilación neta).

¿Qué medir y cómo hacerlo?

Lo ideal es medir TCR en base a la masa seca de la planta completa, incluyendo las raíces. El análisis del crecimiento requiere una cosecha destructiva de dos o más grupos de plantas individuales (una recolección inicial y una final) que hayan crecido tanto bajo condiciones controladas de laboratorio como en el campo. Los individuos deberían estar aclimatados a las condiciones de crecimiento actuales. El número real de plantas que deben ser colectadas para una estimación confiable aumenta con la variabilidad en la población. La variabilidad en el tamaño de los individuos? puede ser reducida haciendo crecer un gran número de plantas y seleccionando *a priori* individuos de tamaños similares para el experimento, descartando los individuos grandes y los pequeños. Como alternativa, las plantas pueden ser agrupadas por observación directa en categorías por tamaño, con igual número de plantas por categoría que el número de recolecciones. Para recolectar una planta de cada categoría cada vez, cada recolección debería incluir una muestra representativa de la población total estudiada. Los intervalos entre cada recolección pueden variar desde menos de una semana (en el caso de las especies herbáceas de rápido crecimiento) hasta más de dos meses (en el caso de individuos juveniles de especies leñosas de crecimiento lento). Como regla práctica, los intervalos de recolección deben ser elegidos de tal forma que las plantas hayan ganado menos del doble de masa durante ese intervalo.

En la recolección, se excava el sistema radical completo y a continuación se lo limpia, lavando el suelo cuidadosamente (ver detalles sobre el procedimiento en 5). Las plantas se dividen en tres partes funcionales: hojas (intercepción de luz y absorción de carbono), tallo (soporte y transporte) y raíces (absorción de agua y nutrientes; almacenaje). Los pecíolos pueden también estar incluidos en la fracción del tallo (reflejan el soporte, ésta es la opción que preferimos), o incluirlos en la fracción de hojas (a la cual los pecíolos pertenecen morfológicamente), o pueden ser medidos por separado. El área foliar debe ser medida (por detalles ver 3.1) antes de que las diferentes partes de la planta sean secadas en estufa por al menos 48 horas a 70° C y pesadas.

Las recolecciones destructivas proveen de mucha información pero son extremadamente laboriosas y, por su naturaleza, destruyen al menos una parte de los materiales estudiados. Alternativamente, o adicionalmente, se puede hacer un seguimiento no destructivo del crecimiento para un número de individuos (ca. 10-15 de individuos por tratamiento) midiendo algún aspecto del tamaño de la planta en dos o más momentos en el tiempo. Al medir repetidamente

los mismos individuos se puede obtener una impresión más precisa de la TCR. Sin embargo, la TCR no puede ser factorizado en sus componentes. Además, si los individuos son manipulados repetidamente puede causarse un retardo en el crecimiento. Idealmente, en especies leñosas, se determina todo el volumen de los tallos (y ramas) (ver 4.1), o el área total de hojas en el caso de las plantas herbáceas. En este último caso, el largo y ancho de la hoja se miden junto con el número de hojas. A fin de estimar el área foliar, se debe usar una muestra de hojas separada (ca.20), para determinar la pendiente de la regresión lineal del largo de la hoja por el ancho.

¿Cómo calcular la TCR?

De dos colectas consecutivas en t_1 y t_2 , recolectando masa vegetal M_1 y M_2 , el promedio de TCR es igual a:

$$TCR = (\ln M_2 - \ln M_1) / (t_2 - t_1)$$

En el caso de un diseño bien balanceado, donde las plantas están apareadas, probablemente lo más sencillo sea calcular TCR y sus parámetros de crecimiento para cada par de plantas, y luego usar los valores de TCR para cada par para promediar en la población. Por lo demás, el promedio de la TCR en todo el grupo de plantas es calculado con la misma ecuación. Al hacerlo, asegurarse de primero transformar la masa total de cada planta antes de promediar. En el caso de más de dos recolecciones, el promedio de TCR debe ser derivado de la pendiente de la regresión lineal del ln (masa) sobre el tiempo.

El promedio de TUF en un período dado es:

$$TUF = [(M_2 - M_1) / (A_2 - A_1)] \times [(\ln A_2 - \ln A_1) / (t_2 - t_1)]$$

Donde A_1 y A_2 representan el área foliar en t_1 y t_2 , respectivamente. Nuevamente, la opción más simple es calcular TUF de cada par de plantas.

El promedio de la Relación de Masa Foliar (RMF) durante ese período es el promedio de los valores de la primera y la segunda recolección:

$$RMF = [(M_{H1} / M_1) + (M_{H2} / M_2)] / 2$$

Donde M_{H1} y M_{H2} indican la masa foliar en t_1 y t_2 , respectivamente

De manera similar, el promedio de AFE es:

$$AFE = [(A_1 / M_{H1}) + (A_2 / M_{H2})] / 2$$

Casos especiales o extras

- (1) *Errores en los registros atribuibles al tamaño de la semilla:* Especialmente las plántulas de especies arbóreas pueden aprovechar las reservas de las semillas por un largo tiempo después de la germinación. La inclusión de la semilla en la masa total de la planta va a

causar entonces una sobrestimación del crecimiento. Por eso, para semillas grandes y persistentes la disminución en la masa de la semilla entre t_1 y t_2 puede ser sumada a M_1 (excluyendo la masa de la semilla de M_1 y M_2)

- (2) *Desviación ontogénica*: A medida que las plantas cambian en el tiempo, reajustan su asignación de biomasa, morfología y fisiología foliar. Como consecuencia de ello, RMF, AFE y TUF podrían cambiar con el tamaño de la planta, y TCR generalmente disminuye a lo largo del tiempo, sobre todo en las especies de crecimiento rápido. Esto no desmerece el uso de la TCR, puesto que el crecimiento de una planta no es necesariamente estrictamente exponencial. Siempre y cuando el crecimiento de la planta sea de alguna manera proporcional al tamaño de la planta actual, TCR es un parámetro apropiado que encapsula el promedio de la TCR en un período de tiempo dado. Sin embargo, la desviación ontogénica es una característica importante del crecimiento de una planta, y una alta frecuencia de recolección puede proveer un mejor entendimiento del fenómeno. Al comparar especies o tratamientos, podría ser una opción comparar plantas de un tamaño dado o un intervalo de tamaños, más que en un período de tiempo dado.
- (3) *Relacionado con la desviación ontogénica*: los arbustos y árboles acumulan crecientes cantidades de xilema del que una proporción importante no es tejido vivo, dependiendo de la especie. Esta masa inerte reduciría en gran medida la TCR. Estudios previos expresan la TCR (“tasa de producción relativa”) de las partes vivas de las grandes plantas leñosas tratando el incremento de biomasa durante el año 1 como M_1 y el incremento durante el año 2 como M_2 . Las mediciones también se podrían basar en los incrementos en el diámetro anual (o en el volumen).
- (4) *Curvas suaves*: En el caso de recolecciones frecuentes (pequeñas cantidades de biomasa), puede aplicarse una técnica especial, en la que curvas polinomiales son ajustadas a los datos. ¡Esto es un arte en sí mismo!

Referencias sobre la teoría, significado y bases de datos: Evans (1972); Grime and Hunt (1975); Kitajima (1994); Cornelissen *et al.* (1996); Walters and Reich (1999); Poorter and Nagel (2000); Poorter and Garnier (2007); Rees *et al.* (2010).

Más sobre métodos: Evans (1972); Causton and Venus (1981); Hunt (1982); Poorter and Lewis (1986); Poorter and Welschen (1993); Cornelissen *et al.* (1996); Rees *et al.* (2010).

2.12 Inflamabilidad de plantas

Los caracteres que aumentan la inflamabilidad influyen considerablemente sobre el régimen de fuego en regiones

(periódicamente) secas, y por lo tanto tienen impactos ecológicos importantes (particularmente en la dinámica del ecosistema), así como consecuencias socioeconómicas y climáticas. La inflamabilidad intrínseca de una planta depende tanto de sus caracteres cuando está viva como del efecto de sus hojas, ramas y tallos luego de la muerte de estos órganos. La inflamabilidad de estos órganos (ya sea vivos o muertos) depende de (1) el tipo y la calidad del tejido, y (2) la arquitectura y estructura de la planta y sus órganos (las cuales afectan principalmente la conductividad del calor).

Note que la inflamabilidad de una determinada especie puede ser enmascarada por la inflamabilidad de la comunidad de plantas en su conjunto (por ej. cantidad de broza, estructura y continuidad de la comunidad, contenido de materia orgánica del suelo) y por las condiciones climáticas particulares (por ej. luego de un período largo de sequía, muchas plantas arderán independientemente de su inflamabilidad).

¿Cómo definirla y medirla?

La inflamabilidad (definida en sentido amplio como la propensión a quemarse) es un carácter funcional compuesto. Sus componentes varían según los autores y las disciplinas. La mayoría de los estudios se basan en la medición de la inflamabilidad de pequeños fragmentos de plantas en cámaras bajo condiciones controladas (en laboratorio). Aunque estos procedimientos producen resultados altamente estandarizados, no necesariamente son buenos estimadores de la inflamabilidad de porciones enteras de plantas. Aquí proponemos un método estándar para medir inflamabilidad en el cual la estructura y arquitectura básica de la porción de planta medida es preservada (ver *Más sobre métodos* en esta Sección, y la Fig. 2 para una ilustración). Este método involucra un aparato de tecnología muy simple en el cual se colocan porciones de plantas de hasta 70 cm de longitud, que son pre-calentadas y encendidas de una forma estándar, y luego se realizan las siguientes mediciones:

- a) *temperatura máxima* alcanzada durante el quemado (en °C; TM, o MT por sus siglas en inglés), medida con un termómetro infrarrojo desde una distancia de 50 cm hasta la muestra;
- b) *tasa de quemado* (TQ, o BR por sus siglas en inglés), es un valor obtenido al dividir la longitud de la muestra que se quemó (en cm) por el tiempo en el que ese fragmento se quemó (en segundos). Esta tasa da una idea de cuán rápido las llamas pueden esparcirse a través de la planta y hasta qué punto la planta es capaz de trasladar el fuego; y
- c) *porcentaje de biomasa consumida* (BC, o BB por sus siglas en inglés) consiste en una estimación visual de la biomasa consumida (intervalos porcentuales); los intervalos son 1 = <1%, 2 = 1–10%, 3 = 11–25%, 4 =

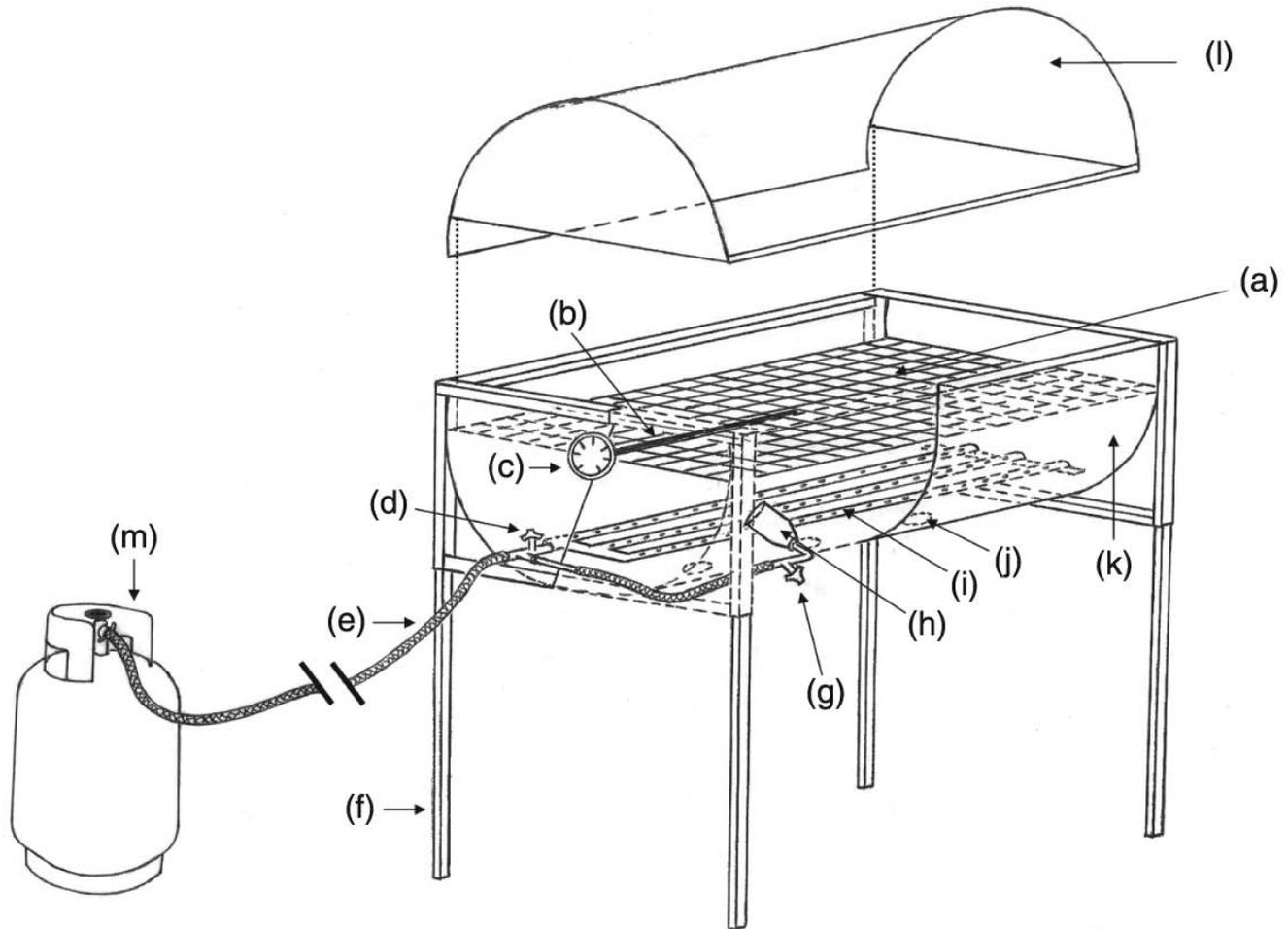


Fig. 2. Vista general del dispositivo para medición a campo de la inflamabilidad de plantas (reproducido con autorización de Jaureguiberry *et al.* 2011). (a) parrilla; (b) termómetro de la parrilla; (c) regulador de temperatura; (d) válvula de seguridad; (e) conexión al cilindro de gas; (f) patas removibles; (g) válvula del soplete; (h) soplete; (i) quemadores; (j) agujeros de ventilación; (k) barril contenedor; (l) protección contra el viento, removible; (m) cilindro de gas. Ver el texto principal para especificaciones técnicas.

26–50%, 5 = 51–75% and 6 = 76–100%.

Luego de realizadas las mediciones anteriores, para calcular la inflamabilidad total los valores obtenidos para cada componente deben ser transformados a una escala proporcional, en donde el valor 1 es asignado a un valor de referencia. En el caso de BC, el valor 1 se asignó al valor máximo posible de este componente (i.e. 6), mientras que para los otros componentes el valor de referencia se basó en la literatura y en los resultados de nuestros experimentos. Los valores de referencia son: TM = 500°C; TQ = 1 cm⁻¹. Los valores estandarizados de TM, TQ y BC son luego sumados para obtener un valor compuesto de inflamabilidad (redondeado a dos decimales) que puede variar entre 0 (inflamabilidad nula) y ~3 (máxima inflamabilidad).

Como alternativa a la medición directa de inflamabilidad, se puede obtener una estimación midiendo varios atributos de las plantas que se sabe influyen la inflamabilidad de la misma. Para cada uno de los atributos descritos abajo (contenido de agua de tallos y ramas, arquitectura de la copa, relaciones superficie:volumen, biomasa muerta en pie, aceites, ceras y resinas volátiles) se definen cinco clases. La inflamabilidad es luego calculada como el promedio (redondeado a un decimal) de los valores de las clases asignados a cada uno de los atributos individuales mencionados (ver en Tabla 1 los rangos de valores de cada atributo dentro de cada clase). Recomendamos poner a prueba y calibrar esta estimación contra mediciones directas de inflamabilidad como se describió más arriba, o contra mediciones directas de ignitabilidad y combustibilidad como se describe en *Casos especiales y extras* en esta Sección.

Tabla 1. Caracteres de inflamabilidad de plantas.

En esta Tabla se muestran las clases a las que se pueden asignar los caracteres componentes para estimar inflamabilidad. La inflamabilidad en sí misma se calcula promediando los valores de clase (redondeando a 1 decimal) de todos los componentes de la inflamabilidad. La inflamabilidad va de 1 a 5. Para calcular el tiempo de secado de las ramas terminales (que es muy probable que esté inversamente relacionado con el contenido de materia seca de las ramas terminales, recomendamos consultar la sección 4.2. Contenido de materia seca en ramas terminales).

Caracteres componentes	Clases de inflamabilidad				
	1	2	3	4	5
Contenido de materia seca de ramas terminales (mg g ⁻¹)	< 200	200-400	400-600	600-800	> 800
Tiempo de secado de ramas terminales (day)	≥ 5	4	3	2	≤ 1
Contenido de materia seca foliar (mg g ⁻¹)	< 150 mg	150-300	300-500	500-700	> 700
Grado de ramificación (ramificación) (cantidad de órdenes de ramificación)	Sin ramas	Solo ramas de 1 ^{er} orden	2 órdenes de ramificación	3 órdenes de ramificación	≤ 4 órdenes de ramificación
Área de la hoja (área de la lámina) (mm ²)	> 25000	2500-25000	250-2500	25-250	< 25
Presencia de hojarasca o broza fina en la época seca	No	Alguna	Bastantes (con hojas secas / ramas terminales o corteza floja)	Más biomasa muerta que viva sobre el suelo	Ramas enteras muertas
Presencia de aceites volátiles, ceras y/o resinas	No	Algunas	Bastantes	Abundantes	Muy abundantes

Contenido de agua de ramas y hojas. Es esperable que la inflamabilidad sea mayor en especies con mayor contenido foliar de materia seca (ver protocolo en Sección 3.3) y contenido de materia seca de ramas (ver protocolo en Sección 4.2) y es probablemente también una función de la tasa de secado (aquí representado inversamente por el tiempo de secado desde la saturación hasta el equilibrio de secado).

Arquitectura de la copa. Las plantas con arquitecturas complejas, i.e. con una extensa ramificación, tienden a esparcir el fuego fácilmente. El grado (número de órdenes) de ramificación se utiliza aquí como un predictor cercano de la complejidad arquitectural de la copa, y su valor varía entre cero (sin ramas) y 5 (cuatro o más órdenes de ramificación) (ver Sección 2.7).

Relaciones superficie:volumen. Las ramas más pequeñas (i.e. ramas con una sección transversal de área pequeña) y las hojas más pequeñas deberían tener una mayor relación superficie:volumen (y por ende una tasa de secado más rápida) y por lo tanto deberían ser más inflamables. Dado que el tamaño de las ramas y las hojas tiende a estar correlacionado en comparaciones inter-específicas, de acuerdo con reglas alométricas, en este protocolo utilizamos el tamaño de la hoja para representar ambos caracteres. Una complicación que puede aparecer es que algunas especies no tienen hojas durante la estación seca. Sin embargo, es muy probable que la broza de esas mismas especies todavía esté presente en la comunidad y afecte la inflamabilidad durante la temporada seca (ver Sección 3.2). Debe tenerse en cuenta que en incendios de superficie, una acumulación sustancial de broza de especies de hojas pequeñas podría formar una capa densa y compacta, obstruyendo el flujo de oxígeno e inhibiendo la propagación del fuego considerablemente.

Biomasa muerta en pie. La cantidad relativa de material vegetal fino muerto (ramas, hojas, inflorescencias, corteza) todavía adherida a la planta durante la estación seca es crítica, ya que estos materiales tienden a tener un muy bajo contenido de agua y por lo tanto aumentan la inflamabilidad de las plantas. Se considera como material vegetal fino todo aquel con un diámetro o espesor menor a 6mm. Definimos cinco clases subjetivas desde 'sin material vegetal fino muerto en pie', via 'material vegetal fino muerto en pie sustancial' a 'planta entera muerta en pie'.

Aceites volátiles, ceras y resinas contribuyen a la inflamabilidad en varias especies de plantas. Este es un carácter categórico subjetivo que varía desde 'ausentes' hasta 'concentraciones muy altas'. Debe prestarse atención a los olores aromáticos (o a olores fuertes o desagradables), así como a sustancias pegajosas, que son liberadas al frotar, romper o cortar distintas partes de la planta. Flores y frutos aromáticos no son diagnósticos para este carácter.

Casos especiales y extras

- (1) *Ignitabilidad* indica cuán fácilmente una planta se enciende (i.e. comienza a producir una llama). Puede ser medida directamente a través de la medición del tiempo requerido para que una parte de la planta produzca una llama cuando es expuesta a una determinada fuente de calor localizada a una distancia establecida. Los experimentos de ignitabilidad se realizan usualmente numerosas veces (por ej. 50 veces), y los diferentes combustibles son clasificados teniendo en cuenta tanto la proporción de igniciones exitosas (frecuencia de ignición) y el tiempo requerido para producir llamas (demora de ignición). Los tejidos que producen

llamas rápidamente en la mayoría de las pruebas son clasificados como extremadamente inflamables, mientras que los tejidos que rara vez producen una llama y/o requieren mucho tiempo para producir una llama son considerados de muy baja ignitabilidad. Estos experimentos son realizados en el laboratorio bajo condiciones controladas (humedad y temperatura) colocando una fuente de calor (por ej. un radiador eléctrico, un epirradiator, o una llama expuesta) a una distancia determinada (unos pocos centímetros) de la muestra. Los valores usados para clasificar las especies de acuerdo con su ignitabilidad dependen del tipo y el poder de la fuente de calor, de la distancia entre la fuente de calor y la muestra, de la forma y el tamaño de las muestras y de la humedad relativa del ambiente en los días previos a la prueba; estas condiciones experimentales deberían ser mantenidas constantes para todas las pruebas y todas las muestras. Aquí proponemos utilizar una llama expuesta a 420 °C, colocando el material vegetal a 4cm de la llama. Se utiliza una cantidad estándar de 1g de material fresco.

- (2) *Conductividad del calor de los tejidos de la planta (combustibilidad)*. Puede ser medida por el contenido de calor (valor calorífico, kJ g^{-1}), el cual es una medida general de la energía térmica potencial que puede ser liberada durante el quemado del combustible. Se mide con un calorímetro adiabático de bomba usando porciones del combustibles de ~1 g. La humedad relativa del ambiente en los días previos a la prueba debe ser estandarizada. La evidencia muestra que el contenido de calor varía relativamente poco entre especies y no es un componente importante de la variación interespecífica de la inflamabilidad.
- (3) *Combustibilidad y variables estructurales*. Respecto a la relación superficie:volumen, otras variables estructurales han sido utilizadas para caracterizar la combustibilidad, especialmente la proporción de biomasa de diferentes clases de combustible (distribución de tamaños). Típicamente, las clases de combustibles usadas son las fracciones de biomasa de (1) follaje, (2) combustible leñoso fino vivo (<6-mm de diámetro; a veces subdividido en <2.5 y 2.5–6 mm), (3) combustible leñoso fino muerto (<6 mm), y (4) combustible leñoso grueso (6–25, 26–75, >75 mm). La proporción sumada de combustibles finos vivos y muertos (follaje y leñosos de <6 mm) podría ser el mejor estimador de la relación total superficie:volumen.
- (4) *Densidad aparente del combustible (= peso del combustible/volumen del combustible) y compactibilidad de la copa* (relación volumen del combustible:volumen de la copa). Ambos componentes han sido utilizados para caracterizar la conductividad del calor, principalmente a nivel de población y

comunidad. Valores altos en estas características sumados a una alta acumulación de broza y una baja tasa de descomposición de la misma incrementan la combustibilidad de la comunidad.

Referencias sobre teoría, significancia y grandes bases de datos: Mutch (1970); Rothermel (1972); Bond and Midgley (1995); Bond and Van Wilgen (1996); Schwilk and Ackerly (2001); Gill and Zylstra (2005); Scarff and Westoby (2006); Cornwell *et al.* (2009); Pausas *et al.* (2012).

Más bibliografía sobre métodos: Papió and Trabaud (1990); Stephens *et al.* (1994); Valette (1997); Dimitrakopoulos and Panov (2001); Etlinger and Beall (2004); Scarff and Westoby (2006); Van Altena *et al.* (2012); para inflamabilidad de porciones enteras como se describió más arriba, ver Jaureguiberry *et al.* (2011).

2.13. Caracteres relacionados al uso del agua

Las plantas juegan un rol clave en los ciclos hidrológicos de los ecosistemas terrestres, incluyendo la captura, la retención y (re) distribución espacial del agua superficial y subterránea, y la pérdida de agua por evaporación y transpiración. Hay diferencias considerables entre las especies en el grado y la manera en la cual éstas influyen en el flujo de agua. Las diferencias entre especies afectan no sólo su propio crecimiento y supervivencia sino también procesos ecosistémicos clave tales como el crecimiento y el reciclado de nutrientes, a través de efectos directos e indirectos en la distribución de la humedad. Esta sección se enfoca en los caracteres de las plantas que afectan el flujo hidrológico externo a las plantas, y por consiguiente excluye los caracteres relacionados con el flujo de agua en la planta o el almacenamiento de agua en la planta (ver 3.3 y 4.4, entre otros). Las diferencias entre especies en el impacto sobre el flujo de agua se deben principalmente a diferencias en la arquitectura de la planta, la morfología y las características de la superficie, todas las cuales pueden ser cuantificadas. Otros efectos importantes que no serán discutidos aquí son los de la acumulación de mantillo y la presencia de pequeñas plantas sobre el escurrimiento superficial y la infiltración, y también el efecto de las raíces sobre los movimientos subterráneos de agua a través de vías preferenciales y la alteración de la hidráulica de los suelos.

Una gran parte de la precipitación incidente golpea la superficie de las plantas antes de alcanzar el suelo. El destino de esa agua puede ser: (1) escurrimiento; (2) retención seguida de evaporación o absorción en la hoja; (3) liberación como escurrimiento a consecuencia del drenaje de las superficies foliares saturadas; (4) drenaje vía ramas pequeñas y tallos (flujo caulinar). La precipitación alcanza el suelo como flujo foliar o flujo caulinar. La interceptación de la lluvia caída regula la cantidad de agua que llega al suelo (y

a las raíces de las plantas) y puede asegurar un suministro de agua menos erosivo durante y después de lluvias copiosas. La intercepción de agua está influenciada por la densidad de las copas de las plantas presentes y por su habilidad de retener agua en su superficie. La retención de agua en la superficie de las plantas es mayor con bajas intensidades de lluvia y en ausencia de vientos. A medida que se aproximan a la saturación, la intercepción de más cantidad de agua lleva al drenaje del exceso de agua (pero ver intercepción de niebla en *Casos especiales y extras*, más abajo) Los caracteres de las plantas que determinan la retención de agua real en las superficies de las plantas en un ambiente dado son los ángulos y la mojabilidad de la hoja. Las superficies foliares más hidrofóbicas van a presentar ángulos de contacto agudos entre las gotas de agua y la superficie de la planta (hoja o tronco) y las gotas tienden a quedar separadas, mientras que las superficies hidrofílicas tienen ángulos de contacto pequeños y el agua se distribuye sobre la superficie como una película. Los caracteres de la superficie que más afectan la mojabilidad son las ceras cuticulares y los tricomas.

¿Cómo tomar las mediciones?

1. *Apertura de la copa.* La apertura de la copa es un determinante importante de la fracción de escurrimiento libre (p) (así como su intercepción de luz). Recomendamos tomar medidas de plantas individuales por especie, que posean una mínima superposición de la copa con sus vecinos y un mínimo follaje de los vecinos debajo de su copa. La apertura de la copa puede ser estimada fotográficamente. Para ello, el lente debe ser sostenido cuidadosamente en forma horizontal debajo de la copa y capturar con la imagen sólo la copa entera. Si las fotografías digitales tienen suficiente contraste, se puede calcular la fracción de cielo (luz) relativa a la cobertura de follaje (oscuro) dentro del contorno de la copa mediante un software para manejo de imágenes. Si el tiempo o los recursos son limitados la apertura de la copa abierta puede utilizarse para predecir el escurrimiento libre. Sin embargo, p no es necesariamente igual a la apertura de la copa, porque las gotas de lluvia no caen siempre estrictamente de forma vertical. Ver más abajo *Casos especiales y extras* para la medición directa de p .
 2. *Flujo caulinar.* El flujo caulinar puede ser cuantificado mediante la colocación de collares o espirales alrededor de los tallos y la canalización/recolección del agua que corre hacia/por los tallos en un colector. Usualmente, se fija alrededor del tallo un molde flexible con forma de canaleta (por ej. una manguera cortada a la mitad) y se sella con silicona, u otro impermeabilizante, en su base al tallo. En el fondo de la canaleta una manguera lleva el agua capturada a un colector. Los collares y
- los colectores deben ser capaces de contener grandes volúmenes de agua porque el escurrimiento por los tallos concentra el agua interceptada por grandes áreas de follaje. Para mediciones cuantitativas sobre el alcance de la canalización del agua a través de los tallos de las diferentes especies, es importante hacer comparaciones en situaciones similares de precipitaciones o utilizando simuladores de lluvia. El escurrimiento por los tallos varía con el tamaño y arquitectura de la planta, por lo que estos caracteres influyen sobre la capacidad de almacenaje de agua en los tallos, la inclinación de los ángulos de los tallos, el alcance de las ramas, etc. Desde la perspectiva de los caracteres de las plantas, el flujo por los tallos se expresa mejor como un porcentaje del volumen de lluvia que cae sobre la planta:
- $$\text{Escurrimiento por los tallos [\%]} = \frac{\text{Escurrimiento por los tallos [L]} / (\text{precipitación [mm]} \times \text{área protegida por la copa [m}^2]) \times 100\%}{}$$
3. *Retención de agua sobre las superficies de la planta.* Este parámetro puede ser estimado a nivel de la planta completa o para partes de la planta (tales como hojas o tallos). El procedimiento involucra: 1) pesar de la planta (o su fragmento) sin la superficie de agua; 2) humedecer la planta (o su fragmento); y 3) pesar la planta (o su fragmento) ya humedecido. La cantidad de agua retenida puede ser expresada en formas diferentes, incluyendo agua por unidad de superficie o por área de proyección de la copa. El humedecimiento puede ser logrado por inmersión o por simulación de lluvia o niebla. La inmersión tenderá a mostrar el máximo de retención de agua, lo cual, en el campo, es al azar. Las estimaciones más realistas son obtenidas usando precipitaciones naturales o simuladas con plantas en el campo. Se pueden encontrar diseños para simuladores de lluvia o niebla en la literatura sobre erosión del suelo y aplicación de pesticidas, respectivamente. La retención de lluvia también puede ser estimada como la intercepción total (precipitación menos flujo de follaje y flujo caulinar) de un evento de lluvia discreto que es sólo suficientemente grande como para saturar la copa, en una situación de evaporación insignificante. Esta medición da una estimación de la retención de agua, en situaciones donde pesar es impráctico o imposible.
 4. *Mojabilidad de la hoja.* Con qué facilidad una hoja puede humedecerse se determina midiendo los ángulos de contacto entre las gotas de agua y la superficie de la hoja. Las hojas en las superficies repelentes al agua tienen grandes ángulos de contacto y son más esféricas. Se coloca con una pipeta una gota de volumen estándar (2-5 μL) sobre la superficie de la hoja y se observa desde un lado usando un microscopio. El microscopio puede estar ajustado con un goniómetro para la medición directa del ángulo, o se pueden obtener imágenes con

una cámara. Una alternativa a la medición del ángulo de contacto es su cálculo basado en mediciones del área de contacto entre la gota y la hoja.

La estrategia de muestreo depende del objetivo de la investigación. Elegir hojas al azar o seleccionarlas de una forma estandarizada de acuerdo a la posición de la hoja en la planta o la edad de la hoja. Para la mayoría de las hojas, la superficie superior (usualmente adaxial) es la superficie lógica para mediciones de mojabilidad. Para otras, particularmente aquéllas isolaterales o tipo aguja, así como también hojas que están expuestas a menudo a lluvias que caen diagonalmente, niebla o neblina, se recomienda hacer mediciones en ambas caras de la hoja.

5. *Capacidad de retención de gotas.* Puede ser medida colocando una gota de agua en la superficie horizontal de la hoja y midiendo el ángulo de inclinación de la hoja al cual la gota comienza a moverse. Es útil medir la habilidad de retención de las gotas en las mismas hojas que fueron usadas para medir mojabilidad.

Casos especiales o extras

- (1) *Escurrimiento libre* (p). El parámetro p puede ser estimado gráficamente como la pendiente de la línea de regresión que describe la relación entre el escurrimiento y la lluvia, usando los eventos de precipitación que son insuficientes en cantidad e intensidad para causar escurrimiento en estas plantas. Si la precipitación es registrada continuamente, las observaciones hechas inmediatamente después del comienzo de eventos de precipitación importantes pueden ser utilizadas también. Para aplicaciones a pequeña escala y en estudios comparativos, se pueden usar simuladores de lluvia. En la mayoría de los casos, el escurrimiento libre va a ser ligeramente sobreestimado porque parte de la lluvia que golpea la vegetación puede no ser retenida debido a la fuerza del impacto o debido al movimiento de las copas. En la bibliografía hidrológica se pueden encontrar descriptos métodos para la cuantificación de la lluvia y del escurrimiento (medidores comerciales de lluvia como pluviómetros o pluviógrafos, colectores o embudos de lluvia hechos a medida, canales, bandejas amplias). Para mediciones continuas de precipitación se utilizan artefactos tales como mecanismos de cubetas basculantes (que transmiten sus datos a registradores continuos (*dataloggers*)). La variabilidad del escurrimiento debajo de las plantas es muy grande debido al agrupamiento del follaje y a la canalización hacia el centro de la planta o hacia las partes más externas de la copa. Puede ser de utilidad tomar en cuenta esos patrones muestreando a lo largo de los radios de la planta. El muestreo representativo (áreas iguales) de partes concéntricas de la corona se logra siguiendo la regla $r_n = \sqrt{n} * r_1$, donde r_n es la distancia entre el colector n y el centro de la planta.
- (2) *Puntas goteantes.* Esta característica morfológica influye sobre la humedad de la hoja y la intercepción de agua acelerando el drenaje de las hojas mojadas. En las hojas con puntas goteantes el agua es canalizada hacia una larga y estrecha punta en la parte más baja de una hoja colgante, que es incapaz de retener el agua acumulada. De esta forma se reduce la duración de la humedad de la hoja. La medición del largo de las puntas goteantes implica decidir en qué posición se encuentra el inicio de esa punta goteante. Recomendamos que para establecer ese inicio se dibuje una hoja con punta reducida normalmente (ángulo agudo u obtuso) y se la compare con la que posee la punta goteante.
- (3) *Absorción de agua por las hojas.* Una cierta fracción del agua que es interceptada por las hojas puede ser absorbida en su superficie. Típicamente, el agua en las hojas mojadas constituye una película de unos 0.2 mm de espesor. Mientras la mayoría de esta agua se habrá evaporado antes de poder ser absorbida, la absorción de agua dentro de la hoja puede ser significativa aún en ambientes no áridos. La absorción de agua por la superficie de la hoja es particularmente eficiente en plantas con tricomas especializadas, tales como algunas bromelias. La tasa y cantidad de agua absorbida por una hoja se puede determinar directamente mediante su pesado.
- (4) *Intercepción de niebla.* La niebla consiste en pequeñas gotas de agua que se depositan sobre la superficie de las plantas a través del flujo de aire más que por la gravedad (“precipitación horizontal”). Su intercepción puede ser una ganancia neta porque la niebla no se precipitaría normalmente en ausencia de vegetación que la capture. La intercepción de niebla puede ser particularmente importante para muchas epífitas o para plantas de sustratos secos tales como rocas o desiertos costeros. Los caracteres principales de las plantas que afectan la tasa de intercepción de niebla son el área en dirección al flujo del aire (por ej. el área en diagonal a la copa de un árbol) y las dimensiones de los elementos de la copa. Elementos estructurales estrechos con estratos de contornos más delgados son relativamente más eficientes en la captura de niebla. Los tricomas (ver iii) y raíces aéreas, comunes para las epífitas, pueden incrementar aún más la captura de la niebla.
- (5) *Abundancia de epífitas sobre troncos.* La abundancia de epífitas sobre los troncos puede influenciar considerablemente la intercepción de agua de lluvia y niebla, y probablemente el flujo por los tallos, incrementando la retención del agua en la planta

hospedadora y modificando los flujos de agua. Cuando la sobrecarga de epífitas sea importante, debe ser reportada como, por ejemplo, covariable. La cobertura de epífitas puede ser estimada como masa, como porcentaje de cobertura o por conteo de individuos (para epífitas grandes). Luego de esta determinación, sus propiedades para la interceptación y retención pueden ser cuantificadas como se describió arriba.

Referencias sobre la teoría, significado y bases de datos: Skinner *et al.* (1989); Brewer *et al.* (1991); Puigdefábregas and Pugnaire (1999); David *et al.* (2005); Martorell and Ezcurra (2007).

Más sobre métodos: Aston (1979); Herwitz (1985); Veneklaas *et al.* (1990); Meyer (1994); Domingo *et al.* (1998); Brewer and Nuñez (2007); Burd (2007).

3 Caracteres de hoja

3.1 Área foliar específica

El Área Foliar Específica (AFE o SLA por sus siglas en inglés) es el área de una hoja fresca dividida por su peso seco. Nótese que masa foliar por área (MFA o LMA por sus siglas en inglés), masa foliar específica (MFE) y peso foliar específico (PFE) son simplemente $1/\text{AFE}$. El AFE es comúnmente utilizado en análisis de crecimiento debido a que generalmente se correlaciona de manera positiva con la Tasa de Crecimiento Relativo (TCR o RGR por sus siglas en inglés). El AFE tiende a relacionarse de manera positiva con la tasa fotosintética bajo condiciones de saturación de luz (ver Sección 3.10) y con el contenido foliar de nitrógeno (N) (ver Sección 3.6), y negativamente con la longevidad de hoja (ver Sección 3.8) e inversión en compuestos carbonados secundarios de importancia cuantitativa, como son los taninos o la lignina. Las especies de ambientes ricos en nutrientes de modo permanente o temporario (por ejemplo, los desiertos luego de un evento de lluvias) tienden a mostrar en promedio valores de AFE mayores que aquellas especies que crecen en ambientes pobres en recursos. Sin embargo, puede haber una variabilidad considerable entre especies que coexisten en un mismo ambiente.

El área foliar específica es una función del contenido de materia seca foliar (CMSF o LDMC por sus siglas en inglés) y del espesor de la hoja (ver Secciones 3.3 y 3.4, respectivamente). Ambos componentes pueden contribuir al AFE en diferentes grados, dependiendo del grupo de plantas considerado y del hábitat en el que crecen. En bases de datos con especies herbáceas de climas templados, el valores bajos de AFE en las especies de crecimiento lento están relacionado con valores altos de CMSF, más que con valores altos de espesor de hoja. En bases de datos con dominancia

de especies leñosas perennifolias, en cambio, el espesor de la hoja puede tener el mismo grado de influencia que el CMSF sobre el AFE. Por su parte, algunas especies (por ejemplo del género *Oxalis*) que crecen normalmente en microhábitats muy sombríos (y por lo tanto presumiblemente con limitación de recursos) tienen valores altos de AFE al mismo tiempo que poseen bajo espesor de hoja.

En zonas con severas limitaciones de nutrientes son comunes las especies de plantas de crecimiento lento, con hojas esclerófilas (con cutículas y paredes epidérmicas gruesas, muy esclerificadas y con una alta relación entre fibra cruda y proteínas). En ellas los valores bajos de AFE están más asociados a valores altos de CMSF que a valores altos de espesor de hoja. En contraste con esto, en las plantas suculentas que son comunes en zonas secas tropicales o subtropicales estacionales, un bajo AFE se asocia con un bajo CMSF y un alto espesor de hoja. Como consecuencia de estas variaciones, el AFE y sus componentes no siempre están relacionadas de un modo simple entre sí y con gradientes de productividad. Por lo tanto, recomendamos la medición adicional de las dos variables relacionadas, CMSF y espesor, cuando se mide AFE.

¿Qué recolectar y cómo hacerlo?

Recomendamos elegir hojas relativamente jóvenes (presumiblemente más activas fotosintéticamente), pero que estén totalmente expandidas y endurecidas, provenientes de individuos adultos (a menos que el estudio esté focalizado específicamente en plántulas, hojas en desarrollo u hojas senescentes). Siempre que sea posible, evitar hojas con signos de ataque de herbívoros o patógenos, o con una cobertura importante de líquenes, musgos, etc. El AFE es fuertemente afectado por la intensidad de luz. Por lo tanto, para muchas preguntas de investigación (por ejemplo en la comparación general de individuos y especies) es mejor muestrear hojas en la parte externa de la copa (también llamadas hojas “asoleadas”) de plantas creciendo bajo las mejores condiciones posibles.

Para especies que crecen típicamente en el sotobosque, tomar hojas de las partes de la planta más expuestas a la luz solar. Para especies umbrófilas (aquellas que nunca crecen expuestas a luz solar directa), juntar muestras de las partes de la planta más expuestas a la luz, pero evitando aquellas que aparezcan dañadas, estresadas o descoloridas por exceso de irradiación). El raquis (nervadura central similar a un tallo en hojas compuestas) y todas las nervaduras son considerados parte de la hoja para una medición estandarizada de AFE (no obstante, puede encontrar una discusión sobre este tema, y sobre si los pecioloos deben ser incluidos en la medición de AFE, en *Casos especiales o extras* de la presente Sección). Recomendamos juntar ramitas enteras con las hojas aún unidas y no separarlas hasta justo antes de medirlas.

Almacenamiento y procesamiento

Las plantas en el campo pueden encontrarse en un grado desconocido de deshidratación. Esta deshidratación puede generar una contracción de las hojas y, por lo tanto, una medición poco confiable del AFE (ver *Casos especiales o extras* en la presente Sección). Este problema se presenta con mayor importancia en hojas blandas de altos valores de AFE, y es menos importante en hojas esclerófilas, de bajos valores de AFE. Idealmente, las muestras (ramas con las hojas unidas) deben ser cortadas y colocadas rápidamente en frascos o tubos de ensayo, con el extremo cortado sumergido en agua destilada. Si esto no fuese posible, entonces envuelva las muestras en papel humedecido, y colóquelas en bolsas plásticas selladas. En este caso, exhale en la bolsa antes de cerrarla, para asegurar una concentración de dióxido de carbono y humedad del aire que minimicen la pérdida de agua por transpiración. Guarde la bolsa en la oscuridad. Los tejidos de algunas especies xerófilas (por ej. Bromeliáceas, Cactáceas, algunas especies con hojas muy pequeñas y resinosas) se pudren muy rápidamente bajo condiciones de humedad y calor, por lo que es mejor conservarlas secas, en bolsas de papel. Ante la duda (por ej. en especies medianamente suculentas) y si recolectar material en otra oportunidad es difícil, recomendamos recolectar el material de ambas maneras, y utilizar las hojas guardadas en bolsas de papel si aquellas conservadas en bolsas plásticas se descompusieron.

Guardar las muestras recolectadas en una conservadora o heladera (nunca en un congelador) en la oscuridad, hasta el momento de procesamiento en laboratorio. Si no se dispone de conservadora y la temperatura es alta, es mejor guardar las muestras en bolsas plásticas sin agregar humedad. Medir tan pronto como sea posible luego de la recolección y rehidratación, preferentemente dentro de las 24 hs. Si el almacenamiento por más de 24 horas es inevitable, entonces debe hacerse entre 2 y 6°C para evitar la descomposición.

Para la mayoría de las plantas es preferible la rehidratación. En el caso de hojas que hayan sido recolectadas “en seco” (bolsas de papel) o para especies de hojas muy blandas (que poseen valores de AFE mayores que 10–15m² kg⁻¹), la rehidratación es fundamental. Si la rehidratación descrita arriba no fuera posible, entonces las muestras deben colocarse en bolsas plásticas cerradas (con o sin agregar papel húmedo en su interior) por 12 horas. Debe tenerse en cuenta que este último procedimiento puede implicar, en ciertas ocasiones, que algunas especies presenten valores de AFE ~5% menores que aquellas sometidas a rehidratación completa. Especies suculentas y xerófilas no deben rehidratarse por más de 6 horas, con ninguno de los métodos. Si ninguno de los procedimientos de rehidratación funciona, se recomienda coleccionar las muestras de estas especies en la mañana, luego de un evento de lluvia, o unas pocas horas después de un riego abundante.

Mediciones

Cada hoja (incluyendo o excluyendo el pecíolo, ver casos especiales y extras debajo en esta Sección) es separada del tallo y cuidadosamente secada antes de la medición. El área proyectada (como en una fotografía) puede ser medida con medidores especializados de área, como los desarrollados por Delta-T Devices (Cambridge, UK) o LI-COR Q3 (Lincoln, Nebraska, USA). Siempre calibre el medidor de área usando piezas de tamaño conocido antes de medir las hojas, y siempre corrobore (por ej., en el monitor) que la hoja está en posición completamente plana y dentro del área de escaneo. Si va a usar un medidor de AF portátil, asegúrese de que el error de estimación no es demasiado alto para sus objetivos, haciendo una prueba preliminar con áreas foliares escaneadas en el laboratorio, usando un rango de diferentes tamaños de hojas.

Las imágenes de las hojas también pueden ser obtenidas (capturadas) en el campo o laboratorio y guardadas para ser procesadas con posterioridad, por ej. con una cámara digital. Para ello las hojas se acomodan cuidadosamente sobre una superficie de vidrio. La inclusión de una escala o un objeto de tamaño conocido en la imagen permiten calibrar el tamaño. El mejor resultado se obtiene con una cámara montada en un trípode, con dos lámpara alumbrando desde los laterales y sin usar flash.

Una tercera opción es determinar el AF con un escáner de escritorio (con la ventaja de que muchos escáneres pueden alimentarse de energía de una laptop, a través de una conexión USB). Recomendamos escanear en modo color para obtener la mayor información de la imagen y poder discriminar la hoja del fondo. Los escáneres a color también permiten el análisis a posteriori de otras características de interés. En todos los casos, asegurarse que las hojas no están enrolladas ni superpuestas entre sí. Intente poner las hojas tan planas como sea posible, en una posición que permita captar el máximo de sus superficies, pero sin aplastarlas para que el tejido no sea dañado. En algunos casos, cortar las hojas en porciones menores facilita su aplanamiento. En ambos casos, el AF puede ser analizada con un programa de análisis digital de imágenes. Algunos programas gratuitos son Leafarea (A. P. Askew, University of Sheffield, UK, descargable en la sección “herramientas” desde el sitio web de Nucleo DiverSus, ver Caja 1) para otros análisis más complejos que incluyan otros órganos de las plantas, pueden usarse los programas ImageJ (del US National Institute of Health; <http://www.nih.gov>, accedido el 9 de agosto de 2016) y GIMP (GNU Project; <http://www.gnu.org>, accedido el 9 de agosto de 2016).

Transforme la imagen al modelo de color HSV para una mejor separación entre el fondo y la hoja. Más detalles sobre el procesamiento de imágenes pueden encontrarse en Prometheus Wiki (ver Caja 1). Luego de la medición del área, poner la muestra en estufa (láminas y pecíolos juntos o

por separado, dependiendo del objetivo, ver casos especiales o extras en la presente Sección), idealmente a 70°C por 72 horas, o a 80°C por 48 horas (evitar temperaturas mayores); luego determinar el peso seco. Tenga en cuenta que, una vez sacadas del horno, las muestras absorberán algo de humedad del aire. Póngalas en un desecador con sílica gel, o bien de nuevo en el horno, hasta el momento de pesarlas. Cuando se trata de hojas pequeñas, se puede mejorar la exactitud de la medición pesando varias hojas juntas como si fueran una sola y luego dividiendo el peso por el número de hojas. Cuando se conviertan valores de AFE a MFA o viceversa, siempre hágalo para cada réplica individual, más que para el promedio de varias réplicas.

Casos especiales o Extras

- (1) *Pecíolos.* Un punto importante es si los pecíolos deben o no ser incluidos en las mediciones de AFE. La decisión depende de los objetivos del estudio. Algunos autores consideran que el pecíolo es una parte integral de la hoja porque al momento de la abscisión éste cae junto con la lámina y porque provee un soporte y un sistema vascular sin el cual la hoja no podría sobrevivir. Por lo tanto, incluyen al pecíolo en la medición de AFE. Otros autores consideran que el pecíolo no debe ser incluido en la medición de AFE, porque su principal función es e posicionamiento espacial y soporte hidráulico de la hoja, siendo por lo tanto equivalente al tallo mientras que la principal función de la lámina es la intercepción de luz y la fijación de C. El porcentaje del peso seco representado por el pecíolo varía desde el 0% hasta casi el 50%; por lo tanto la inclusión o no del mismo puede modificar el valor de AFE drásticamente. Aunque la inclusión o no del pecíolo puede muchas veces no ser crucial en un estudio en particular, puede representar una fuente de error sistemático e importante cuando se comparan resultados de diferentes estudios, o aun en comparaciones de especies de un sitio con muy diferentes estructuras foliares. Por lo tanto, lo mejor (aunque requiere más tiempo) es medir láminas y pecíolos por separado, de manera que el AFE puede ser calculada de ambas maneras con una misma muestra, facilitando la comparabilidad con otros estudios. Si se usan imágenes digitales, sugerimos escanear o fotografiar los pecíolos y el resto de la hoja en la misma imagen, pero en sectores diferentes, de manera tal que puedan ser tratados en conjunto o por separado; luego pesar los pecíolos por separado del resto de las hojas de la misma réplica. Tome la decisión que mejor se ajuste a sus objetivos, pero posteriormente explicité en su publicación y en sus planillas de datos si los pecíolos fueron incluidos o no en los cálculos.
- (2) *Hojas compuestas.* Algunas veces las hojas poseen un AFE menor debido a sus raquis gruesos. La decisión de incluir o no a los raquis y los pasos prácticos en cada caso son similares que para los pecíolos (ver punto 1, arriba). Como opción por defecto, recomendamos considerar al raquis como parte de la hoja para el cálculo de AFE, indicando esto claramente en la publicación del estudio. Tenga presente que en algunas especies, el raquis puede ser más de 10 veces más pesado que la suma de los folíolos. Otra decisión a tomar en el caso de hojas compuestas es si se considera el valor de un folíolo independiente y representativo o si se toman todos los folíolos de manera conjunta. Como en el caso del raquis y del pecíolo, la decisión depende de os objetivos y, nuevamente, se recomienda especificar cuál fue el criterio, al momento de publicar los resultados. Cada vez que sea posible, registre el área de folíolos individuales y también el área total de la hoja.
- (3) *Contracción del AF.* Las hojas disminuyen su tamaño cuando se deshidratan. La contracción se define como un porcentaje, calculado como $100 \times (1 - \text{área seca} / \text{área saturada})$. La contracción en promedio es del 20%, pero puede alcanzar el 80%, dependiendo de la especie. La máxima contracción de área refleja diferencias estructurales y se correlaciona con otros caracteres de hoja incluyendo conductancia cuticular, parámetros de presión-volumen como el módulo de elasticidad y punto de pérdida de turgencia, contenido de materia seca foliar (CMSF) y espesor de hoja, así como forma de crecimiento y el grado de caducidad. La contracción del AF es tanto un potencial problema (que genera desvíos en mediciones de área foliar en herbarios y fósiles) como un carácter fácilmente medible que refleja múltiples propiedades hidráulicas y estructurales de las hojas. Para medir este carácter, recoja y mida hojas siguiendo el mismo protocolo que para AF y CMSF. Mida el AF proyectada fresca. Corte la hoja en porciones menores en caso de que la misma no sea plana. Este paso es muy importante porque algunas hojas presentan muy poca contracción, por lo que garantizar la medición precisa del área en fresco es crucial. Luego seque la muestra en estufa, aplastada de forma plana en sobres o en una prensa. Mida el área de la hoja seca, procurando que esté en la misma posición que se usó para el área en fresco. Esto será muy difícil o imposible para algunas hojas aciculares; en hojas muy gruesas será necesario cortar previamente varias porciones planas. Luego de esto, calcular la contracción con la fórmula dada anteriormente.
- (4) *Área foliar total vs. Área foliar proyectada.* En hojas “estándar”, el AF se mide como el AF proyectada de una cara de la hoja. No obstante, en hojas que no son planas, el AF proyectada es menor que el AF total. El AF proyectada está relacionada con la intercepción de luz, mientras que el AF total se relaciona con la cantidad de

tejido fotosintéticamente activo. Existen, sin embargo, casos como el enrollamiento de lámina en los pastos, donde tanto la intercepción de luz como el intercambio gaseoso se reducen. Claramente la medición a realizar depende de las preguntas, aunque el conocimiento de ambas permite una visión más abarcativa.

- (5) *Hojas aciculares*. Las hojas aciculares son un caso específico donde el AF total y el AF proyectada no coinciden. El AF proyectada puede ser medida siguiendo los pasos normales; no obstante, debido a que estas hojas son generalmente finas, debe tenerse especial precaución en que el instrumental utilizado tenga suficiente definición. Para una medición gruesa, se puede medir la longitud de la hoja y su ancho con un calibre, y luego multiplicar 2 x largo x ancho.
 - (6) *Hojas diminutas*. Las hojas verdaderas de algunas especies (por ej. *Callitris* sp.) tienen escamas finas ensambladas apretadamente en estructuras semejantes a ramitas. En estos casos, debe considerarse a las mismas como análogas a una hoja, ya que están agrupadas como una unidad.
 - (7) *Hojas de gramíneas y plantas similares*. Usualmente sólo se considera la lámina, excluyendo la vaina. Sin embargo, así como para el caso de los pecíolos, (ver punto 1), la decisión sobre qué medir depende de los objetivos. Muchas especies tienen hojas que tienden a enrollarse o rotar. En esos casos, es más fácil trabajar cortando pedazos de la hoja, en fragmentos de 5-10 cm.
 - (8) *Plantas suculentas y áfilas*. Para plantas cuyos órganos fotosintéticos no son hojas verdaderas, recomendamos tomar la porción de la planta que sea su análogo funcional. Para especies con espinas fotosintéticas o tallos no suculentos (por ej. *Ulex*, *Senna aphylla*), esto puede significar tomar los últimos 2 cm de una rama joven. Para Cactáceas y otras suculentas, recomendamos tomar toda una hoja o su equivalente (por ej. un cladodio joven en *Opuntia*) siempre que sea posible. A veces esto trae algunos problemas prácticos, por ejemplo con hojas completas de *Agave* o costillas de Cactáceas columnares, dado que son difíciles de coleccionar y de procesar por su gran tamaño. En estos casos, es conveniente tomar muestras (de tamaño conocido) de hojas maduras (por ej. En *Agave*) o “costillas” (en cactus) que incluyan epidermis y mesófilo en ambas caras, más el parénquima interno. Aunque este parénquima no siempre contiene clorofila, y algunos autores sugieren que por lo tanto no debe ser considerado en cálculos de AFE, posee un rol fundamental en el metabolismo CAM de las plantas suculentas, por lo que también tiene sentido incluirlo (ver Sección 3.1). Los tallos jóvenes de algunas gramíneas de otras familias (*Eleocharis*, *Juncus*), las “ramitas” laterales de las colas de caballo (*Equisetum*), y otros similares también deben ser considerados como
- hojas. Debido a que muchas de estas especies ocurren en un amplio rango de ambientes, es bueno explicitar el método utilizado en cada caso.
- (9) *Helechos*. Pare los helechos, sólo coleccionar los frondes (las “hojas”) sin los soros productores de esporas, los cuales normalmente se observan como estructuras verdes o marrones, con formas variadas, en el envés o en los márgenes del fronde.
 - (10) *Hojas de árboles altos*. Utilizar, preferentemente, las hojas expuestas al sol en la parte más alta de la copa. Si éstas no pueden ser alcanzadas, algunas personas utilizan hondas, armas de fuego o servicios de escaladores profesionales. En árboles no tan altos una alternativa es considerar las hojas externas expuestas a la luz de la mitad de la copa (las hojas internas son normalmente más viejas) las cuales pueden alcanzarse con tijeras o podadoras montadas en varas extensibles.
 - (11) *Hojas muy grandes*. Una vez colocadas en bolsas plásticas, las hojas grandes pueden ser colocadas en carpetas de tapas duras para evitar que se doblen y arruguen. Si las hojas son más grandes que el escáner, cortar las hojas en partes más pequeñas y medir la sumatoria de las áreas de estos fragmentos. Las hojas con nervaduras y venas muy grandes pueden producir una sombra que sobreestime el AF. En este caso, debe cortarse la nervadura hasta la altura de la superficie de la lámina y escanear la hoja sin esta porción, la cual debe luego incluirse nuevamente en el sobre que va a estufa para la medición del peso seco. En el caso de un raquis grueso, retire el raquis y medir su diámetro y la longitud hasta la mitad, y calcular el área del raquis como el producto de los dos. Luego escanee las hojas sin raquis, pero incluyendo el raquis en el peso seco. Si decide utilizar submuestras y no la hoja entera, asegúrese que sean representativas de la variación de AFE en toda la hoja.
 - (12) *Plantas con heteromorfismo foliar*. En caso de especies con 2 o más tipos de hojas, con diferentes anatomías y formas, por ejemplo en especies con hojas en roseta y en las varas de floración, juntar hojas de ambos tipos, en proporciones representativas a su presencia en la planta, para obtener un valor representativo de AFE.
 - (13) *Opciones simples (“low tech”) para medir AF y AFE en el campo*. Existen situaciones en las que no es posible llevar hojas frescas del campo al laboratorio para el escaneo, o los escáneres portátiles no pueden ser llevados o alimentados con electricidad en el campo. Una solución a este problema es la utilización de cámaras digitales para la obtención de imágenes del área de la hoja (ver *Medición*, más arriba). Otra opción práctica es obtener fragmentos de hojas de área conocida, por ejemplo por medio de una perforadora o sacabocado, evitando venas gruesas y poniendo los

fragmentos en un sobre para que su posterior secado (tomar varias muestras por réplica, debido a que tienden a pesar muy poco). Este es un método rápido y barato para comparar láminas. Sin embargo, sobrestima el AFE en comparación con mediciones que toman toda la hoja, particularmente en hojas grandes de nervaduras y pecíolos gruesos. Por lo tanto, valores de AFE obtenidos con este método no pueden ser comparados con otros obtenidos a partir de hojas completas, a menos que exista una buena calibración. Otra opción es obtener el área en plástico o papel (copiando el contorno de la hoja) y posteriormente medir el área de estos “moldes”, en el laboratorio. Este método es bueno para hojas medianas o grandes, hojas enteras y hojas que no son muy angostas (por ej. no podría aplicarse a pastos xerófilos).

Referencias sobre teoría, significado y bases de datos:

Reich *et al.* (1992, 1999); Garnier and Laurent (1994); Poorter and Garnier (1999); Wilson *et al.* (1999); Castro-Díez *et al.* (2000); Niinemets (2001); Westoby *et al.* (2002); Díaz *et al.* (2004); Paula and Pausas (2006); Wright *et al.* (2007); Poorter *et al.* (2009); Hodgson *et al.* (2011); Blonder *et al.* (2012); Juneau and Tarasoff (2012).

Más sobre métodos: Chen and Black (1992); Garnier *et al.* (2001a, 2001b); Vendramini *et al.* (2002); Vile *et al.* (2005); Niinemets *et al.* (2007).

3.2. Área foliar

El área de una hoja, también llamada Área Foliar (AF), es la métrica más común para analizar tamaño de hoja, y se define como el área proyectada de una cara de la hoja individual, expresada en mm² (ver sección 3.1). La variación interespecífica en AF se ha relacionado con variaciones climáticas, geológicas, latitudinales y longitudinales, donde el estrés por temperatura, sequías, nutrientes y altas radiaciones tiende a seleccionar hojas relativamente pequeñas. Dentro de una zona climática, la variación en AF también puede estar relacionada con factores alométricos (tamaño de la planta, de las ramas, anatomía y arquitectura, número de hojas, número de yemas laterales) y con estrategias ecológicas ante diferentes niveles de estrés por nutrientes y disturbios. Los factores filogenéticos también pueden jugar un rol importante.

¿Qué recolectar y cómo hacerlo?

Para el protocolo de recolección de hojas, seguir lo establecido en el punto 3.1. El AF es bastante variable entre plantas, y por lo tanto se recomienda recolectar un número alto de réplicas (cerca del límite superior de muestras recomendado en el apéndice 1). Para el almacenamiento de las hojas, ver sección 3.1.

Mediciones

En especies con hojas simples, medir la lámina individualmente. Para aquellas con hojas compuestas, se puede medir el AF de la hoja completa o sólo de todos los folíolos, dependiendo de los objetivos. Desde el punto de vista del balance térmico, es importante el área de folíolos, ya que es equivalente a las hojas simples. Para analizar captura total de luz, entonces debe medirse la hoja completa. Idealmente, en especies con hojas compuestas, obtener valores de AF sólo para los folíolos y para la hoja completa., dado que esto permitirá un análisis más profundo de los datos, y una mejor comparabilidad con otras bases de datos. Mida la lámina con o sin pecíolos y raquis, de acuerdo con los objetivos del estudio (ver punto 3.1), indicando esto en su publicación de resultados. Nótese que este AF puede ser diferente del área utilizada para calcular AFE.

Casos especiales o extras

- (1) *Plantas áfilas.* Debido a que la falta de hojas es un carácter funcional importante, se recomienda registrar un valor de cero (en lugar de ausencia de valor) para las especies áfilas. Sin embargo, tenga presente que estos ceros deberán ser excluidos de ciertos análisis. Alternativamente, se recomienda tomar muestras y medir órganos análogos a las hojas (ver sección 3.1).
- (2) *Plantas heterófilas.* Ver sección 3.1
- (3) *Helechos.* Ver sección 3.1.
- (4) *Ancho de hoja.* Este rasgo se mide como el diámetro máximo de un círculo imaginario que pueda ubicarse dentro de la hoja, y es un carácter extra de interés, relacionado con el tamaño de hoja. Las hojas angostas, o las hojas divididas con lóbulos angostos, tienden a tener una capa límite menor y una pérdida de calor más efectiva que las hojas anchas de igual área. Esto es considerado como un rasgo adaptativo en ambientes cálidos y con alta exposición a la radiación solar. Existe evidencia emergente de que el ancho de hoja contribuye más positivamente a la expresión de dominancia de la copa que el área total de la hoja.
- (5) *Número de hojas por nudo.* En algunos casos interesa calcular la biomasa o área total de material fotosintético por nudo, por lo tanto en estos casos se pesa o se mide el área foliar de todas las hojas de un nudo, o bien, si las hojas son uniformes, se calcula el peso seco o el área de una hoja representativa y se multiplica por el número de hojas por nudo.

Referencias sobre teoría, significado y bases de datos:

Raunkiaer (1934); Parkhurst and Loucks (1972); Givnish (1987); Cornelissen (1999); Ackerly *et al.* (2002); Westoby *et al.* (2002); Milla and Reich (2007); Niinemets *et al.*

(2007); Niklas *et al.* (2007); Poorter and Rozendaal (2008); Royer *et al.* (2008).

Más sobre métodos: ver referencias en Más sobre métodos de la sección 3.1.

3.3 Contenido de materia seca foliar

El contenido de materia seca foliar (CMSF; o LDMC por sus siglas en inglés) es el peso seco foliar (mg) obtenido luego de secar en estufa el material, dividido por el peso fresco foliar saturado de agua (g). El contenido de materia seca foliar se expresa típicamente en mg g^{-1} . Usando estas unidades, el contenido de agua foliar (CAF; o LWC por sus siglas en inglés) es simplemente 1000-CMFS. El contenido de materia seca foliar está relacionado con la densidad promedio de los tejidos de la hoja (peso fresco por volumen fresco). En hojas laminares, la relación depende también del área foliar específica (AFE) a través de una relación que involucra el espesor foliar (EF; o L_{th} en inglés) y la densidad foliar promedio (ρF), de la siguiente manera:

$$\text{CMSF} = 1/(\rho F \times \text{AFE} \times \text{EF})$$

Asumiendo que el valor del peso fresco por volumen de las hojas es cercano 1 g cm^{-3} , la ecuación se simplifica a $\text{CMSF} \approx 1/(\text{AFE} \times \text{EF})$. Por lo tanto, CMSF tiende a estar inversamente relacionado al AFE y al EF. Se ha demostrado que el CMSF está negativamente correlacionado con la tasa de crecimiento relativo potencial y positivamente con la longevidad de la hoja. Sin embargo, estas relaciones suelen ser más débiles que aquellas en las cuales está involucrada el AFE. La hojarasca proveniente de hojas con alto CMSF tiende a descomponerse más lentamente que aquella proveniente de hojas con bajo CMSF. Hojas con alto CMSF tienden a ser relativamente duras (ver Sección 3.7), y por lo tanto se asume que son más resistentes a los daños físicos (por ej. herbivoría, viento, granizo) que aquellas hojas que tienen bajo CMSF. Algunos aspectos de las relaciones entre el contenido de agua en las hojas y la inflamabilidad de las mismas (ver Sección 2.12) también dependen del CMSF. Generalmente, pero no siempre, especies con bajo CMSF tienden a estar asociadas con ambientes productivos y, a menudo, altamente disturbados. En los casos en los cuales el AFE es difícil de medir (ver Sección 3.1), el CMSF puede ser un indicador útil y significativo de la misma. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que estos dos caracteres no reflejan las mismas funciones (esto es particularmente evidente en algunos grupos; por ej. las especies suculentas tienen baja tasa de crecimiento, baja AFE y bajo CMSF; ver Sección 3.1).

¿Qué recolectar y cómo hacerlo?

Recomendamos seguir exactamente los procedimientos descritos en la Sección 3.1. Si es posible, es conveniente

realizar las mediciones de CMSF sobre las mismas hojas que luego se utilizarán para medir el AFE. Debe tenerse en cuenta que, como en el caso del AFE, el CMSF puede variar sustancialmente durante el día.

Procesamiento y almacenamiento

Recomendamos proceder del mismo modo que para el AFE, excepto que se debe evitar cualquier almacenamiento en seco (sin embargo, ver el caso particular de especies xerofíticas en la Sección 3.1). Es necesario realizar una rehidratación completa antes de las mediciones.

Mediciones

Luego de la rehidratación, las hojas deben ser separadas del tallo y suavemente secadas con papel absorbente para remover las gotas de agua que puedan quedar en la superficie. Sobre estas hojas se realiza la determinación del peso fresco saturado de agua. Luego las hojas son secadas en una estufa (ver Sección 3.1), y posteriormente debe determinarse su peso seco.

Casos especiales o extras

La mayoría de los comentarios realizados para área foliar específica en la sección 3.1 también se aplican al contenido de materia seca foliar.

Referencias sobre la teoría, significancia y bases de datos: Eliáš (1985); Witkowski and Lamont (1991); Garnier and Laurent (1994); Hodgson *et al.* (1999, 2011); Wilson *et al.* (1999); Garnier *et al.* (2001a); Niinemets (2001); Vile *et al.* (2005); Kazakou *et al.* (2009); Poorter *et al.* (2009).

Más bibliografía sobre métodos: Wilson *et al.* (1999); Garnier *et al.* (2001b); Vendramini *et al.* (2002); Vaieretti *et al.* (2007); Ryser *et al.* (2008).

3.4 Espesor foliar

El espesor foliar (EF; o L_{th} por sus siglas en inglés); medido en μm o mm) es uno de los componentes del área foliar específica (AFE; o SLA por sus siglas en inglés SLA; ver Sección 3.1 y 3.3), ya que $\text{AFE} \approx 1/(\text{densidad del tejido} \times \text{EF})$ (donde la densidad = peso seco/volumen \approx CMSF; ver Sección 3.3).

El espesor foliar es un rasgo determinante de la resistencia física de las hojas (ver Sección 3.7). Por ejemplo, el esfuerzo para romper una hoja es (por definición) el producto del espesor por la dureza del tejido foliar. La Teoría de la Optimización, es decir, el balance entre los beneficios fotosintéticos contra los costos de C por respiración y transpiración, predice que el espesor foliar debería ser más alto en especies que crecen en ambientes más soleados,

más secos y menos fértiles, como así también en hojas más longevas. Estos patrones se han observado frecuentemente, al menos en estudios interespecíficos. Dentro de un mismo individuo, se ha observado que las hojas ubicadas en la parte externa de la copa (expuestas a mayor radiación solar) son más gruesas que aquellas ubicadas en el centro de la copa (expuestas a menor radiación). Tanto dentro como entre especies, el parámetro anatómico que explica mejor la variación en el espesor foliar es el número y el espesor de capas de tejido del mesófilo. Como consecuencia de esto, el espesor foliar es un determinante fundamental del contenido de N foliar por unidad de superficie de hoja. A pesar de que un alto valor de espesor foliar debería estar relacionado a una mayor tasa fotosintética por unidad de área foliar (a través de una relación N:área foliar más alta), esta relación a menudo es débil en estudios interespecíficos por diversas razones. En primer lugar, debido al efecto de la covarianza del área foliar específica y el contenido de N foliar, hojas más gruesas generalmente tienen menor contenido de N foliar y una vida más larga (lo cual está asociado con menores tasas fotosintéticas por unidad de masa foliar). En segundo lugar, especies con hojas más gruesas pueden tener una menor difusión de CO₂ (menor conductancia del mesófilo). Las vías de difusión más lentas pueden producirse por un mayor auto-sombreado de los cloroplastos, o por una mayor reflectancia óptica combinada a una menor transmitancia interna. Las hojas gruesas también son características de las plantas suculentas.

¿Qué recolectar y cómo hacerlo?

Recomendamos seguir exactamente los procedimientos descritos en la Sección 3.1. En muchos casos, se utilizarán las mismas hojas para medir el área foliar específica, el contenido de materia seca foliar y el espesor foliar (y ver quizás Sección 3.7). En el Apéndice 1 se pueden encontrar recomendaciones relacionadas al tamaño muestral más adecuado.

Procesamiento y almacenamiento

Recomendamos proceder del mismo modo que para el área foliar específica (Sección 3.1). El espesor foliar está fuertemente afectado por el contenido de agua foliar, por lo tanto, es necesario realizar alguna forma de rehidratación previo a las mediciones (ver Sección 3.1). Cualquier pérdida de turgencia producirá resultados subestimados, particularmente en el caso de utilizar micrómetro digital.

Mediciones

El espesor foliar tiende a variar a través de la superficie de la hoja, siendo generalmente mayor en la nervadura o vena principal, en los márgenes y en la base de la hoja.

Dependiendo de la pregunta de investigación, el interés puede estar en el espesor foliar promedio a lo largo de la hoja o el espesor foliar en ciertos puntos o tejidos específicos de la misma. Por lo general, para abordar comparaciones interespecíficas es aceptable tomar una medida por hoja, en una posición lo más estándar posible dentro de la lámina de la hoja (es decir, una posición intermedia entre el borde y la nervadura central, y entre el ápice y la base de la hoja, evitando nervaduras secundarias importantes). Si es necesaria una mayor precisión resulta más apropiado el promedio de varias mediciones de espesor en distintos puntos de la lámina. Otra forma de estimar el espesor foliar promedio sobre la superficie total de la hoja es calcular el volumen foliar y dividirlo por el área foliar. Sin embargo, el volumen de la hoja puede resultar bastante laborioso de calcular con precisión, por ejemplo si se utiliza un picnómetro. Una aproximación relativamente rápida al espesor promedio de la hoja entera se puede obtener también dividiendo el peso fresco foliar por el área foliar (lo cual es similar a calcular $1/AFE \times CMSF$); es decir, asumiendo que el peso fresco y el volumen foliar están estrechamente relacionados. Este enfoque no tiene en cuenta la mayor densidad del material foliar seco, o la menor densidad foliar debida a espacios intercelulares; sin embargo, es aceptable para obtener una aproximación del espesor foliar promedio. Si en cambio se quiere distinguir entre el espesor de la nervadura central, los bordes y las regiones intercostales de la hoja, o para comparar réplicas en un determinado punto de la hoja (por ej. en el punto medio entre el ápice y la base de la hoja, como frecuentemente suele hacerse) son necesarios otros enfoques. Para cuantificar estos valores específicos del espesor foliar en distintos puntos, un método consiste en medirlo sobre secciones transversales de la hoja cortada a mano o utilizar análisis de imágenes (ver Sección 3.1 para el software gratuito). Para calcular el espesor foliar promedio a través de la sección de la hoja, se divide el área total de la sección transversal por el ancho de dicha sección. Este método permite obtener valores de espesor foliar bastante exactos. Sin embargo, los tejidos blandos se pueden romper cuando se cortan transversalmente, y el tiempo de medición suele ser relativamente lento (por ej. 15 min. por medición). Probablemente el método más rápido para medir el espesor foliar es utilizar un micrómetro digital (o incluso un transductor de desplazamiento variable lineal, LVDT por sus siglas en inglés). Estos instrumentos permiten realizar múltiples mediciones rápidamente y su promedio da un valor del espesor foliar para un punto específico de la hoja (tal como la nervadura central o la lámina entre las principales nervaduras) o región de interés (por ej. en la región central de la hoja). Si es necesario, recomendamos reemplazar los puntos de contacto del micrómetro con contactos de 2–3mm de diámetro, es decir, lo suficientemente estrecho para caber entre las nervaduras principales, pero lo suficientemente

ancho para no marcar la superficie de la hoja al realizar las mediciones. Sin embargo, en especies con hojas muy blandas tal como *Arabidopsis*, el daño de la superficie de la hoja es muy difícil de evitar.

Casos especiales o extras

- (1) *Acículas*. Para el caso de las acículas, que son circulares en sección transversal, el espesor foliar promedio puede ser rápidamente estimado como diámetro $\times \pi/4$ (equivalente a área de sección transversal dividido por el ancho de sección transversal). Sin embargo, debido a que las acículas se estrechan hacia las puntas, se recomienda realizar varias mediciones a lo largo de las mismas.

Referencias sobre la teoría, significado y bases de datos: Clements (1905); Givnish (1979); Parkhurst (1994); Enríquez *et al.* (1996); Knapp and Carter (1998); Smith *et al.* (1998); Wilson *et al.* (1999); Green and Kruger (2001); Niinemets (2001); Díaz *et al.* (2004).

Más bibliografía sobre métodos: Witkowski and Lamont (1991); Garnier and Laurent (1994); Shipley (1995); Wright and Westoby (2002); Vile *et al.* (2005); Poorter *et al.* (2009); Hodgson *et al.* (2011).

3.5 pH de hojas verdes o de la hojarasca

El pH del tejido foliar verde y de las hojas senescentes (hojarasca), medidos en material molido, haciendo una extracción con agua destilada, varía sustancialmente entre especies. Esta variación es, al menos parcialmente, intrínseca (presumiblemente genética) ya que este pH puede diferir mucho entre especies creciendo en el mismo suelo (y también durante el día en plantas CAM, ver más adelante en *Casos especiales o extras*). El valor de pH foliar de las especies es consistente aún ante variaciones en la química del suelo en el que crecen (incluyendo el pH). El pH del tejido foliar integra los efectos de varios compuestos químicos y diferentes procesos que ocurren en las hojas, y que afectan su capacidad de intercambio de iones de H. Sin embargo, algunas sustancias son determinantes particularmente fuertes del pH del tejido foliar. Altas concentraciones de cationes metálicos (calcio, magnesio, potasio) darán pH altos, mientras que altas concentraciones de ácidos orgánicos y metabolitos secundarios ricos en carbono (compuestos químicos de defensa) tales como taninos, tenderán a dar un pH más bajo. Esto último suele explicar por qué el pH del tejido foliar suele estar correlacionado (negativamente) con importantes caracteres biogeoquímicos tales como concentración de carbono o la relación C/N y (positivamente) con AFE (3.1). El pH del tejido verde se correlaciona positivamente con la digestibilidad, haciéndolo un importante predictor de

palatabilidad para herbívoros, ya que éstos pueden realmente “sentir el sabor” ácido.

Las diferencias en el pH del tejido foliar entre especies tienden a persistir durante la senescencia, por lo que también vale la pena medir el pH de la hojarasca. El pH de la hojarasca puede ser un estimador razonable de la descomponibilidad de la broza, porque el pH del sustrato puede ser importante para los descomponedores. Cambios en la composición de especies que difieren en el pH de su hojarasca, pueden conducir a un cambio en el pH de la broza depositada sobre el suelo y, consecuentemente, en el pH del horizonte orgánico del suelo. Por ejemplo, plantando pinos en suelos con pH altos, dominados por bacterias puede, vía la hojarasca, conducir a un suelo orgánico más ácido luego de algunas décadas, y una comunidad de descomponedores dominada por hongos. Según la pregunta a responder, se decidirá si se miden hojas verdes, senescentes o ambas. Ante la duda, o cuando el objetivo principal no es medir la descomposición se deben usar las hojas verdes.

Consideraciones fisiológicas

Las células de cualquier tejido vegetal constan de tres o más compartimientos delimitados por membranas que pueden, y usualmente tienen, diferentes valores internos de pH. Por lo tanto, el pH del material usado para el método descrito en este protocolo (extraído con agua de material homogeneizado o molido) no debe ser confundido como el pH real de la hoja. El pH real de una hoja es, en realidad, la media ponderada de los valores de pH de los distintos compartimientos de esa hoja. Esos valores pueden ser modificados por las reacciones que ocurren entre los componentes químicos de los diferentes compartimientos, incluyendo vacuolas, cuando todo está mezclado. Si las hojas son secadas en la estufa antes de ser molidas, se producirá una pérdida de compartimentalización mucho antes de que el tejido se muele y ocurrirán reacciones que pueden modificar el pH. Pese a estas consideraciones el pH medido con el protocolo aquí descrito ha demostrado ser representativo del pH de las hojas verdes. Por su parte, como en la hojarasca los procesos metabólicos ya se han detenido, a diferencia de lo que puede ocurrir con las hojas vivas, los valores de pH de la hojarasca debería ser un reflejo fidedigno de las características de la broza al momento del muestreo.

¿Qué recolectar y cómo hacerlo?

Para hojas verdes, ver en 3.1. el procedimientos de recolección y almacenamiento previos al procesamiento. Si las hojas son pequeñas, asegurarse de recolectar suficiente cantidad de hojas para obtener material suficiente para el análisis. La rehidratación inicial de las hojas no es necesaria.

Procesamiento y almacenamiento

Como opción por defecto, todos los pecíolos o raquis deberían ser removidos antes del análisis de pH (pero ver *Casos especiales o extras* en 3.1). Las hojas verdes frescas pueden ser simplemente molidas o picadas como se indica más adelante. También pueden ser utilizadas las hojas recolectadas para análisis de AFE, después de ser secadas en la estufa para obtener su biomasa (ver 3.1). Los valores de pH obtenidos de hojas secadas en estufa son en gran medida comparables a los obtenidos de las hojas frescas. Las hojas secadas al aire o la hojarasca secada de esta misma manera pueden ser molidas como se indica para análisis de N foliar (ver 3.6) y luego ser almacenadas hasta su análisis.

Mediciones

Agregar agua destilada o desmineralizada a la muestra de hoja molida hasta obtener una relación de volumen 8:1 de agua a hojas. Agitar la muestra en un agitador rotatorio por 1 hora, luego centrifugar hasta que haya una clara separación de los sedimentos y el sobrenadante. El pH del sobrenadante puede ser medido utilizando cualquiera de los medidores de pH existentes, siempre que la calibración sea adecuada (utilizando soluciones buffer de pH 4 y 7). Si hay poco volumen de muestra recomendamos adicionar 1.2 ml de agua a 0.15 ml de muestra de hoja molida en un tubo Eppendorf de 2.5 ml luego seguir los procedimientos mencionados más arriba. Dentro de los tubos Eppendorf se puede ajustar perfectamente un electrodo SenTix 41 delgado conectado a un medidor de pH Inolab nivel 2 (ambos WTW, Weilheim, Alemania).

Casos especiales o extras

- (1) *Mediciones adicionales en hojas frescas.* Aunque las mediciones en hojas secas, molidas suelen coincidir bastante con aquéllas hechas en hojas frescas, para varios propósitos específicos puede ser de interés es recomendable medir el Ph también en hojas frescas (donde los contenidos de las células han permanecido intactas hasta poco antes de las mediciones). Esto puede ser útil para seguir los cambios diurnos en pH de la hoja que puedan ser indicadores de CAM (ver 3.12). Cuando medimos el pH de las hojas, y comparamos plantas CAM con otras plantas, es mejor recolectar las hojas de las plantas CAM a la tarde, por ej. después de la acumulación de ácidos que se produce en estas plantas durante la noche. El molido de las hojas frescas no siempre funciona bien porque los sólidos pueden adherirse a las superficies o a las bolas del molino, haciendo la limpieza entre muestras muy laboriosa. En lugar de esto recomendamos el picado de las muestras de

hojas en fragmentos de alrededor de 1mm de diámetro con una hoja de afeitar o una picadora automática de la que se obtengan fragmentos comparables. Este procedimiento debería ser hecho inmediatamente antes del agitado y centrifugado.

Referencias sobre la teoría, significado y bases de datos: Zinke (1962); Marschner (2012); Finzi *et al.* (1998); Cornelissen *et al.* (2006); Freschet *et al.* (2010); Cornelissen *et al.* (2011).

Más bibliografía sobre métodos: Cornelissen *et al.* (2006); Cornelissen *et al.* (2011).

3.6 Concentración de nitrógeno foliar y concentración de fósforo foliar

La concentración de nitrógeno foliar (CNF) y la concentración de fósforo foliar (CFF) son las cantidades totales de N y P, respectivamente, por unidad de masa foliar seca, expresadas en mg g⁻¹ (o a veces como % de masa foliar seca). Los rankings interespecíficos para CNF y CFF están a menudo correlacionados. Entre especies, el CNF suele estar fuertemente correlacionado con máxima tasa fotosintética (por unidad de masa) y con el AFE. Un CNF o CFF alto están generalmente asociados con alta calidad nutricional para los consumidores en las cadenas alimentarias. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los CNF y CFF de una especie dada suele variar significativamente con la disponibilidad de N y P en el ambiente. La relación CNF/CFF (proporción N a P) es a menudo utilizada como una herramienta para estimar si la disponibilidad de N o P es más limitante para el crecimiento de la planta. Las especies que son activamente fijadoras de nitrógeno, como por ejemplo muchas leguminosas, tienden a tener una proporción CNF/CFF más alta que otras plantas creciendo en el mismo sitio.

¿Qué recolectar y cómo hacerlo?

Ver 3.10 para los procedimientos de colección de hojas. Para estas mediciones la rehidratación inicial no es necesaria. Los pecíolos o raquis son a menudo cortados antes de los análisis de CNF y CFF, pero pueden ser incluidos dependiendo de los objetivos del estudio (ver en 3.1 para la discusión sobre cuándo considerar pecíolos y raquis). Secar en estufa a 60 a 70°C por 72hs. Las hojas utilizadas para análisis de AF o AFE pueden ser usadas para medir CNF y CFF, siempre que la temperatura de secado no haya superado los 70°C. Para las repeticiones, ver 3.1. pero asegurarse de coleccionar material suficiente para las réplicas, de acuerdo al método analítico y el equipamiento a utilizar (alrededor de 2g de materia seca por réplica para N y 5g para P en el caso de digestión ácida, 0.2 g para N en el caso de técnicas de combustión, ver más adelante en esta misma sección).

Mediciones

Existen diversas técnicas disponibles para medir los CNF y CFF en material vegetal molido. La macro- o micro digestión (ácida) Kjeldahl, seguida por un análisis colorimétrico (inyección de flujo, utilizando diferentes reactivos para N y P), se ha usado ampliamente. La digestión ácido-húmeda seguida por la formación del complejo fosfomolibdeno azul desde ortofosfato es un método más preciso para la medición del P total. Alternativamente, se puede medir P mediante ICP- OES (Plasma de Acoplamiento Inductivo). La digestión Kjeldahl para el análisis de N está siendo reemplazada, cada vez más, por métodos que emplean una combinación de análisis de combustión, convirtiendo la materia orgánica en N_2 y CO_2 , seguida por espectrometría de masa o cromatografía gaseosa. Estas técnicas de combustión proveen tanto la concentración de N como la de C en la hoja, y si se hacen con analizadores automatizados de N son generalmente menos laboriosos e intensivos químicamente que los análisis Kjeldahl. Las técnicas de combustión generalmente también recuperan más N que los análisis Kjeldahl, porque algunas fracciones de N (por ej. NO_2^- , NO_3^- y algunos compuestos de N cíclicos) no reaccionan en los análisis Kjeldahl. Sin embargo, creemos que todos estos métodos estándar deberían dar valores razonablemente precisos de CNF y CFF. Recomendamos analizar un material estándar de referencia con valores de CNF y CFF conocidos junto con las muestras.

Casos especiales o extras

- (1) *Plantas heterófilas y áfilas*. Ver sección 3.1.

Referencias sobre la teoría, significado y bases de datos: Chapin (1980); Field and Mooney (1986); Lambers and Poorter (1992); Aerts (1996); Cornelissen *et al.* (1997); Grime *et al.* (1997); Reich *et al.* (1997); Aerts and Chapin (2000); Wright *et al.* (2004); Reich *et al.* (2010).

3.7 Resistencia física de las hojas

Las hojas físicamente más fuertes están mejor protegidas contra daños mecánicos por factores abióticos (viento, granizo) y bióticos (herbivoría, pisoteo), contribuyendo a mayores tiempos de vida de las hojas. La dureza de una hoja es un buen indicador de la inversión en C para protección estructural de los tejidos fotosintéticos en general. Estas características también tienen efectos una vez muerta la hoja, ya que las hojas más duras o resistentes constituirán hojarasca que se descompone más lentamente.

Debido a que las hojas tienen diferentes propiedades de resistencia dependiendo de la dirección en que es ejercida la fuerza, la resistencia física de una hoja puede definirse

y medirse de diferentes maneras. Las tres propiedades más frecuentemente medidas son la fuerza para rasgar, el trabajo para cortar y la fuerza para perforar (F_t , W_s y F_p por sus siglas en inglés, respectivamente). F_t es la fuerza requerida para cortar una hoja o un fragmento de hoja, dividido por su ancho, y expresada en $kN m^{-1}$ o $N mm^{-1}$. Nótese que previamente también se ha definido F_t como “fuerza tensil foliar”. W_s , llamada algunas veces “fuerza de fractura”, refleja la fuerza necesaria para cortar una hoja o fragmento de hoja a un ángulo y velocidad constantes, expresada en N o su análogo, $J m^{-1}$. F_p es la fuerza necesaria para atravesar un perforador a través de una hoja o fragmento (expresada en $N mm^{-1}$). Tanto W_s como F_p están fuertemente influenciados por el espesor de hoja. (Ver sección 3.4).

¿Qué recolectar y cómo colectarlo?

Para el protocolo de recolección de hojas, seguir lo establecido en el punto 3.1; para conocer los tamaños de muestra recomendados, ver el Apéndice 1.

Almacenamiento y procesamiento

Seguir los procedimientos descritos en la sección 3.1 y mantener las muestras en conservadora o heladera. La rehidratación no es indispensable, aunque es deseable para los casos en que se necesite medir el espesor de hoja de manera precisa. Medir tan pronto como sea posible luego de la recolección, preferentemente dentro de las 72 horas para especies de hojas blandas, las hojas más duras tienden a mantener su dureza por varios días. Si no es posible realizar las mediciones dentro del período sugerido (por ej., las muestras deben ser transportadas a sitios distantes), una alternativa es secar las muestras al aire, colocándolas entre hojas de papel absorbente en un herbario, inmediatamente luego de la recolección. En este caso, sí será necesaria una rehidratación previamente a las mediciones. La dureza de hojas frescas y rehidratadas está bien correlacionada para hojas de especies esclerófilas y pastos, tanto en el caso de F_t como de W_s .

Mediciones

Para hojas frescas las mediciones se realizan directamente sobre el material almacenado en las bolsas. Para hojas secadas al aire, proceder primero a la rehidratación colocando las muestras entre papeles absorbentes saturados de agua y guardándolas en bolsas plásticas selladas en la heladera, por 24 horas (una hidratación con rociador puede ser mejor para especies xerofíticas, sensibles a la pudrición, ver Sección 3.1). Aquí, describiremos tres métodos que han producido buenos resultados y para los cuales existen instrumentales de medición desarrollados específicamente. Si usted tiene la posibilidad, recomendamos medir la propiedad

más relacionada al proceso de su interés. Por ejemplo, en el caso de herbivoría por pastoreadores vertebrados, la F_t es probablemente la propiedad más relevante, mientras que si el interés se centra en insectos masticadores o en pisoteo por mamíferos, entonces W_s sería la mejor aproximación a la propiedad de interés (Tabla 2).

- (1) *Pruebas tensiles o de rasgado*. La fuerza para rasgar (F_t) puede ser medida de una manera fácil y económica, con un aparato muy simple que incluye un dinamómetro con un rango de 0 a 3 kg (Figura 3.a). Para hacerlo, corte un fragmento de la hoja de la parte central, pero excluyendo la nervadura central, a menos que ésta no sea muy prominente (por ej. en algunas Poáceas o Liliáceas), o que la hoja sea tan pequeña como para no poder hacerlo sin la ayuda de una lupa. El largo del fragmento debe seguir el eje longitudinal de la hoja (misma dirección que la nervadura central). El ancho del fragmento variará entre 1 mm (en especies muy duras) y 10 mm (en especies muy blandas). Siempre que sea posible, se recomienda usar fragmentos con una relación largo:ancho entre 5 y 10, para asegurar que la fuerza es ejercida a lo largo del eje principal. Medir el ancho exacto de la muestra antes de colocarla en el aparato. Ubicarla perpendicularmente a los bordes de los cepos, luego fije con éstos los dos extremos de la muestra. Haga esto delicadamente, sin dañar los tejidos. Para

ello, una fina pieza de goma adherida a los bordes de los cepos puede ser de utilidad. Las hojas muy pequeñas, hojas muy duras o resbalosas, y hojas suculentas, deben ser fijadas más fuertemente por medio del uso de cinta adhesiva doble faz. Una vez fijada la muestra, tirar lentamente con fuerza creciente, hasta que la hoja se corte. Preste atención al dinamómetro para leer la fuerza ejercida al momento del corte. Para la conversión de unidades, recuerde que $1\text{kg}=9,81\text{N}$. Divida la fuerza total por el ancho de la muestra para obtener F_t . Exprese el resultado en N mm^{-1} . Existen otros instrumentos más sofisticados para medir F_t , como el tensiómetro Instron 5542 (Canton, MA, USA) o (con adaptaciones), el Mecmesin Ultra Test Tensiometer (Mecmesin, Slinfold, UK). Las hojas muy blandas para mostrar un valor real de medición con el aparato, reciben un valor arbitrario de fuerza de rasgado de cero. Para hojas demasiado duras para ser cortadas, primero se debe intentar cortar un fragmento más angosto (menos de un mm en caso de ser necesario y posible). Si aun así no puede cortarse, entonces esa muestra recibe un valor igual al máximo posible que arroja el aparato (asumiendo un ancho de muestra de 1 mm). En el caso de especies suculentas (o tallos modificados), los cuales se “escapan” de los cepos en el aparato, realice las mediciones en fragmentos de epidermis.

Tabla 2. Tipos de pruebas usadas comúnmente para medir propiedades mecánicas de las hojas.

	<i>Prueba de rasgado</i>	<i>Prueba de Corte</i>	<i>Prueba de perforación</i>
Propiedad medida	Resistencia de la hoja a una fuerza tensil F_t	Resistencia de la hoja a una fuerza de corte W_s	Resistencia de la hoja a una fuerza de presión F_p
Unidades	N mm^{-1}	J m^{-1}	N mm^{-1}
Aparato	Aparato de fuerza tensil (Hendry and Grime 1993) Máquina de prueba universal (4202, Instron, High Wycombe, Bucks, UK, Wright and Illius 1995)	Máquina con una hoja de corte (Wright and Cannon 2001) Máquina con tijera de corte (Darvell <i>et al.</i> 1996) Máquina de prueba universal: 4202, Instron, High Wycombe, Bucks, UK (Wright and Illius 1995)	Máquina de prueba universal: 5542, Instron, Canton, MA, USA (Onoda <i>et al.</i> 2008); Shimadzu DCS-5000 (Lucas <i>et al.</i> 1991).
Objetivos del estudio	Herbivoría por mamíferos pastoreadores y otros herbívoros tiradores (por ej. caracoles); Descomposición; Identificación de estrategias de las plantas para uso de recursos	Herbivoría por insectos cortadores y pequeños vertebrados; Impacto de los herbívoros en la vegetación (por ej. pisoteo); Descomposición Identificación de estrategias de las plantas para uso de recursos	Herbivoría por insectos cortadores o chupadores; Descomposición; Identificación de estrategias de las plantas para uso de recursos

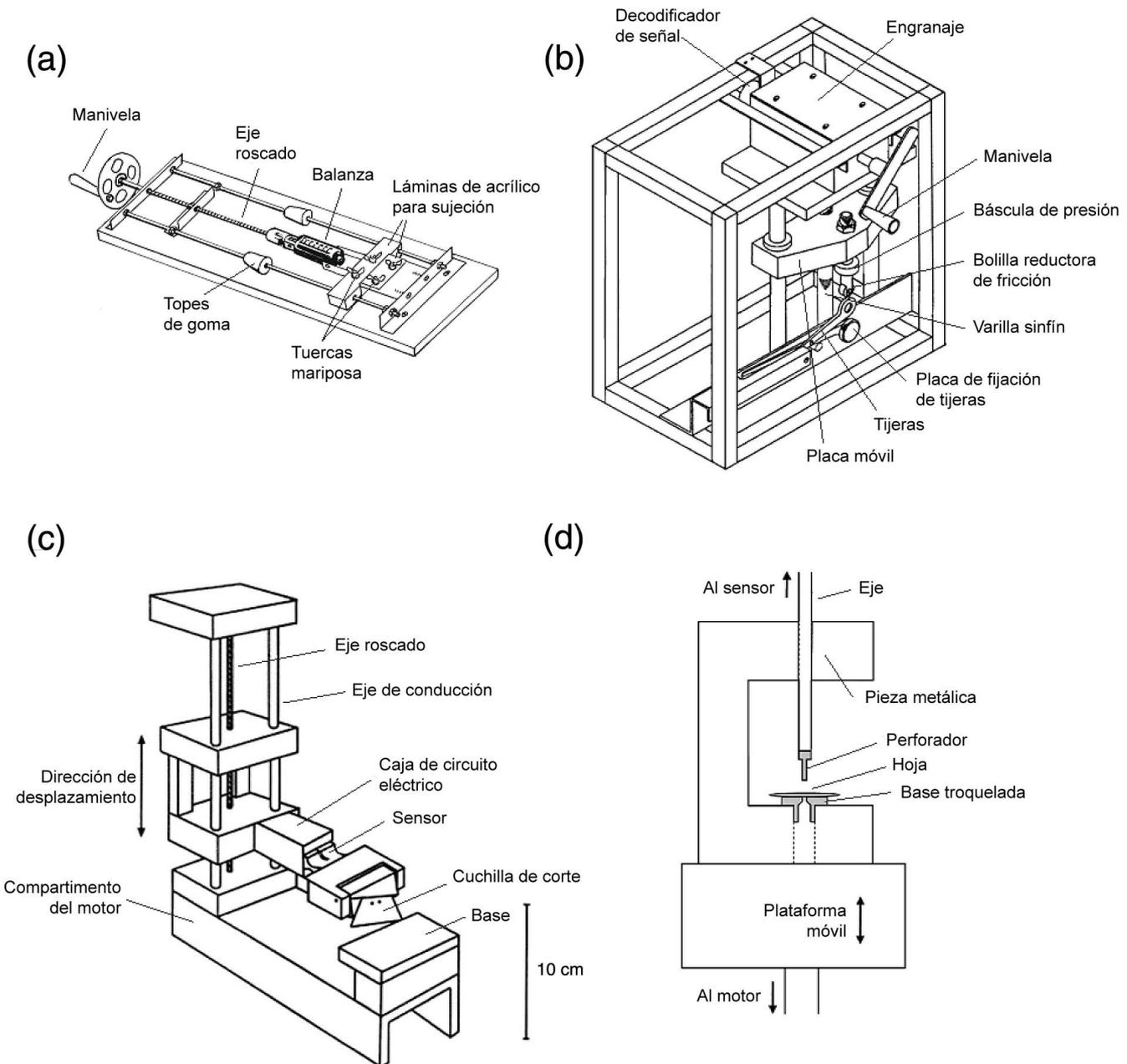


Fig. 3. Diferentes aparatos para medir la dureza física de las hojas. Diagramas que representan distintos dispositivos usados para: (a) Pruebas de rasgado, según se describe en Grime (1993); (b) Pruebas de corte con tijera (prototipo de Darvell *et al.* 1996; un dispositivo similar se describe en Wright e Illius 1995); (c) Pruebas de corte vertical o cizalla, reproducido de Wright y Cannon (2001) (en este diagrama no se muestran las protecciones de seguridad, el sujetador de muestras de apertura rápida ni la unidad de control electrónica); y (d) Prueba de pinchado, de Aranwela *et al.* (1999).

(2) *Pruebas de corte o cizallamiento.* Al menos cinco aparatos han sido utilizados para medir trabajo de corte (W_c). Todos ellos miden la cantidad de trabajo se necesita para cortar una hoja, ya sea con una hoja de corte simple contra una base, o con un par de hojas de corte (tijeras). Un aparato portátil y ampliamente usado

para medir la fuerza promedio para cortar una hoja a una velocidad y un ángulo constante (20°) se muestra en la figura 3.b. Otro aparato, no portátil, para esta medición se muestra en la Figura 3.c. En ambos casos, el aparato consiste de una parte mecánica, una fuente de potencia y una computadora en la cual se registra

un archivo de salida. Para proceder con estos aparatos, primero debe realizarse una calibración de acuerdo a las especificaciones particulares de cada uno. Debe tenerse en cuenta que esta metodología es altamente sensible, el operador debe evitar toda fuente externa de posible error o interferencia (vibraciones, viento). Además, debe limpiarse adecuadamente la o las hojas de corte con un paño embebido en alcohol. Medir con precisión el espesor de la hoja o fragmento (lámina o nervadura) con un calibre, antes de colocarla en el aparato. Luego, coloque la muestra en la plataforma y fijela con sus soportes. Las hojas son cortadas perpendicularmente a la nervadura central, a la altura de mayor ancho de la hoja, o en la mitad entre la base y la punta de la misma, en el caso de que el punto de ancho máximo sea difícil de definir). En algunos estudios, la nervadura central se elimina para obtener el valor correspondiente a la lámina solamente (o se miden ambas cosas, pero por separado). Como alternativa (aunque menos precisa), el operador puede remover una parte de los datos, que representan la nervadura cortada, y analizar este dato por separado. El procedimiento para calcular el valor final difiere entre los diferentes aparatos. Para hacerlo, deberá referirse a los diferentes manuales de usuario. Una copia calibrada del dispositivo mostrado en la figura 3.c se encuentra disponible para su uso en el CNRS en Montpellier, Francia (contactar a Eric Garnier, email: garnier@cefe.cnrs-mop.fr).

- (3) *Pruebas de perforación.* La Fuerza para perforar (F_p) es la resistencia del tejido de la hoja (particularmente epidermis) a la ruptura, excluyendo la dureza aportada por las nervaduras y venas. Diferentes penetrómetros (Figura 3.d) han sido utilizados en el pasado (no existe un diseño estándar). Todos ellos tienen un perforador en la punta, que puede ser una aguja o una punta roma (con un diámetro aproximado de 0,5 – 5,5 mm) unido a una pequeña balanza o a un medidor de peso (siendo éste un recipiente llenado gradualmente con agua, y pesado luego de la perforación). El perforador atraviesa una plataforma con un orificio en el centro. Se recomienda dejar una luz de 0,05-0,1 mm entre el perforador y los bordes del hueco en la plataforma, a los fines de evitar errores por fricción entre estos componentes. Una punta afilada en el perforador permite también evitar sobrestimaciones de la fuerza necesaria, resultado más de la compresión y tensión que del corte en sí. Para estandarizar la fuerza por unidad de longitud, se debe dividir la fuerza por la circunferencia del perforador. El dato se expresa en $N\ mm^{-1}$. La consistencia de valores en diferentes puntos de la hoja tiende a ser consistente, en tanto se eviten nervaduras y venas. 3 mediciones por hoja son probablemente suficientes. Este test no funciona bien para muchos pastos y otras monocotiledóneas. Este método

ha sido más utilizado en los trópicos. Algunos estudios recientes han incorporado el perforador a aparatos más sofisticados diseñados para medir propiedades de los materiales (como el Instron 5542).

Casos especiales o extras

- (1) *Plantas áfilas.* Ver sección 3.1.
- (2) *Dureza del tejido de la hoja o dureza específica de la hoja.* Este interesante parámetro adicional puede obtenerse al dividir la F_p , W_s o F_p por el espesor (promedio) de la muestra. La medición del espesor de hoja (en mm) para este fin es comúnmente obtenida con un calibre, inmediatamente después de medir el ancho de la muestra, y antes de ubicarla en el aparato de medición.

Referencias sobre teoría, significado y bases de datos: Coley (1988); Choong *et al.* (1992); Grubb (1992); Turner (1994); Wright and Vincent (1996); Cornelissen *et al.* (1999); Lucas *et al.* (2000); Díaz *et al.* (2004); Read and Stokes (2006); Kitajima and Poorter (2010); Onoda *et al.* (2011).

Más sobre métodos: Hendry and Grime (1993); Darvell *et al.* (1996); Aranwela *et al.* (1999); Wright and Cannon (2001).

3.8 Longevidad y duración del follaje verde

La longevidad de una hoja es definida como el período de tiempo durante el cual una hoja individual (o una estructura análoga a la hoja) o una parte de una hoja (ver Monocotiledóneas más adelante en el texto) está viva y fisiológicamente activa. Se expresa en días, meses o años. La longevidad de las hojas se relaciona con la estrategia de uso de los nutrientes de una planta, por lo que está relacionada con otros caracteres importantes de la planta tales como tasa de crecimiento potencial, eficiencia en el uso de nutrientes, y descomponibilidad de la broza. Que una planta sea muy longeva es a menudo considerado un mecanismo para conservar nutrientes y/o para reducir los costos respiratorios en hábitats con estrés ambiental o bajo suministro de recursos. Especies con hojas de vida más larga tienden a invertir mayor cantidad de recursos en la protección de las hojas y, en parte a consecuencia de eso, crecen más lentamente que especies con hojas de vida más corta. Además, las hojas de vida larga conservan los nutrientes internos por más tiempo. La broza procedente de hojas de larga vida tiende a ser relativamente de descomposición más lenta.

La longevidad de la hoja no indica necesariamente la fenología de crecimiento o la proporción del año que una planta es capaz de hacer fotosíntesis. Esto es porque las hojas pueden envejecer todas juntas (como en las especies decíduas), o su senescencia puede extenderse en un

período mucho más largo, en ese caso una planta puede mantener muchas cohortes de hojas de diferentes edades simultáneamente, como en muchas especies perennifolias templadas. Además, algunas perennifolias tropicales mantienen una copa de hojas verdes continuamente, pero poseen hojas de longevidad muy corta, porque tienen una tasa alta y continua de producción de hojas.

Para entender la habilidad de una planta de explotar su luz ambiental dependiente de las estaciones, así como la sincronización de su crecimiento, es útil medir también la duración del período (meses por año) en el que la copa foliar (o la principal unidad fotosintética análoga) está verde. Esta medida constituye un importante componente del ritmo del crecimiento de una planta, o fenología. Algunas especies de plantas que se caracterizan por evitar la competencia (incluyendo las que son colonizadoras de claros) pueden tener períodos muy cortos de exhibición de hojas fuera del pico máximo de follaje de las especies más competitivas. Algunas geófitas primaverales logran un crecimiento importante al principio de la estación favorable, antes de que la copa verde se cierre. En contraste, muchas especies perennifolias tienen una habilidad de fotosintetizar a lo largo de todo el año. Se puede obtener información detallada sobre el monitoreo de todos los aspectos de fenología de las plantas en las redes armadas para este propósito, incluyendo la NPN (<http://www.usanpn.org/>, accedido el 9 de agosto de 2016) y el Proyecto Budburst (<http://www.budburst.org>, accedido el 9 de agosto de 2016).

a) Medición de la longevidad de la hoja

Se requieren diferentes métodos para taxa con diferentes tipos de patrones fenológicos y de demografía foliar. En todos los casos en donde se desea obtener una medida general, se deben seleccionar individuos y hojas usando los mismos criterios indicados en la sección 3.1.

1. *Dicotiledóneas*: El método 1.1 (aquí abajo) es el mejor, pero también el más laborioso y requiere un período de tiempo de medición mayor. Los métodos de 2 a 4 pueden reemplazar al número 1, pero sólo si se cumplen los criterios indicados más abajo.

1.1. *Censos periódicos de hojas etiquetadas o mapeadas*. Hacer un seguimiento del nacimiento y muerte de hojas individuales a lo largo del tiempo a través de censos es la forma más precisa de determinar la longevidad foliar, pero también es la más laboriosa. Para realizar los registros se deben etiquetar o mapear hojas individuales (no cotiledones) cuando aparecen por primera vez en un censo, y luego registrar periódicamente (a intervalos de aproximadamente un décimo de la longevidad que se estima tendrá la especie) si están vivas o muertas. Como el intervalo entre

censos aumenta en relación con la media de la longevidad, la precisión de cada medición individual va a disminuir con la longevidad. Mediante un tamaño de muestra suficientemente grande la estimación de la media debería conservar su precisión. La información que identifica a cada hoja debe ser registrada en la hoja misma (o cerca sobre la rama, pero en una forma sistemática para que no se preste a confusiones), a menudo se hace con un código breve (tal como colores y/o símbolos). Alternativamente, se puede dibujar una rama y hoja, o un mapa de ellas, y se pueden utilizar diferentes colores en cada fecha de censo. En este método, la posición en la rama que separa hojas producidas en consecutivos intervalos entre censos debe ser marcada. Las hojas producidas en un intervalo entre censos dado se deben dibujar de tal forma que su posición espacial relativa sea clara. En el primer censo en el que la hoja ya no está presente o completa o mayormente muerta) se la tacha en el dibujo con el color del censo actual. Para cada planta individual, seleccionar dos o más ramas o tallos y muestrear todas las hojas sobre ellos. Tener en cuenta que son necesarias un total de al menos 40, e idealmente 160 hojas, por especie (ver Apéndice 1). Para lograr este número, recomendamos incrementar el número de individuos, más que el número de ramas o tallos por individuo. Calcular la longevidad de cada hoja individual y tomar el promedio por planta individual. Además de proveer la estimación más precisa de la media y la mediana de la longevidad de la hoja, este método también permite obtener la frecuencia de distribución y estimar la varianza, lo que la mayoría de los otros métodos no permiten.

1.2. *Conteo de hojas producidas y muertas en un intervalo de tiempo*: Contar (para cada tallo o rama) el número total de hojas producidas y muertas en un intervalo de tiempo que represente un período de aparente equilibrio entre producción de hojas y su mortalidad (ver abajo en este protocolo). Recomendamos hacer alrededor de ocho conteos a lo largo de este intervalo de tiempo, pero una frecuencia mayor puede ser recomendable en algunos casos. Luego, estimar la media de la longevidad de la hoja como la distancia media de tiempo entre número acumulado de hojas producidas y el número acumulado de la mortalidad de hojas (graficando la producción de hojas y la mortalidad de hojas en el tiempo). Este es un buen método si los censos son lo suficientemente amplios como para cubrir la periodicidad estacional (típicamente es necesario

abarcar desde varios meses hasta un año si hay periodicidad estacional) y la rama o tallo está en un cuasi-equilibrio en términos de producción de hojas y mortalidad. Este período puede ser mucho más corto para las plantas de rápido crecimiento; como las pioneras en la selva tropical lluviosa, las pioneras leñosas en zonas templadas o muchas hierbas. Esta técnica es útil para plantas en su fase de crecimiento exponencial, y para plantas con alta longevidad foliar (porque permite conseguir los datos más rápidamente). El número de individuos y hojas es el mismo que en el método 1.1.

- 1.3. *Observar una cohorte de hojas hasta que la mitad haya muerto.* Este método mide la mediana de la longevidad foliar. Para realizar el registro debe contarse el número de hojas que aparecen entre dos censos. Periódicamente se debe volver a visitar la misma planta y contar el número de hojas que quedan. Este método es efectivo cuando se producen muchas hojas en un período corto de tiempo. Se debe ser cuidadoso en tomar las mediciones para cohortes consecutivas múltiples, si hay posibilidades de que la variación estacional o interanual cause cambios en la duración de las diferentes cohortes. El número de individuos y hojas es el mismo que en el método a.1.1.
- 1.4. *Contar "cohortes"* para muchas coníferas y sólo algunas angiospermas leñosas. Para usar este método en angiospermas leñosas es importante estar muy familiarizado con la especie. Este método es muy fácil y rápido, pero sólo puede ser utilizado si es conocido que la especie produce follaje a intervalos regulares conocidos (lo más frecuente es una vez por año) y cada sucesiva cohorte puede ser identificada tanto por diferencias en las propiedades del follaje, por cicatrices o por otras marcas sobre el tallo/rama. Para realizar el registro con este método se debe contar, rama por rama, el número de cohortes con más del 50 % del follaje original remanente, y usar ese dato como una estimación de la media de la durabilidad de las hojas. Esto sirve si hay poca mortalidad de hojas para cohortes más jóvenes, y la mayor mortalidad ocurre en el año de recambio máximo. Muchas coníferas, especialmente *Pinus* y *Picea*, muestran este patrón, aunque algunas especies de *Pinus* pueden tener picos de producción de hojas o de senescencia más de una vez al año. Este método tiene una leve sobreestimación, puesto que hay alguna mortalidad en cohortes más jóvenes, y usualmente ninguna o muy pocas sobrevivientes en las cohortes más viejas que la del pico de regeneración/recambio. Este método

también puede servir (a) si hay alguna mortalidad en cohortes más jóvenes y una proporción aproximadamente igual de sobrevivientes en cohortes más viejas que la primera cohorte con > 50% de mortalidad, o (b) si se estima el % de mortalidad cohorte por cohorte. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que algunas coníferas pueden aparentar haber perdido las hojas (agujas) a juzgar por las cicatrices que nunca estuvieron allí en primer lugar por sus estructuras reproductivas. Tenga en cuenta que en los climas de tipo mediterráneo algunas especies experimentan dos estaciones de crecimiento cada año. En general se debe contar un tallo (preferentemente el principal o el tallo dominante en la copa más alta) de por lo menos diez plantas individuales.

- 1.5. *Duración del follaje verde* para especies que producen la mayoría de sus hojas en una cohorte simple dentro de un período corto y las pierden a todas en un corto período de tiempo (ver (b) Duración del follaje verde, más abajo). Este método es posiblemente el menos preciso de los cinco que aquí se describen.
2. *Monocotiledóneas:* Para algunas especies de monocotiledóneas, la longevidad de la lámina entera puede ser medida como se describió arriba. Sin embargo, dados los hábitos de crecimiento de muchas monocotiledóneas (ver más adelante en este protocolo), esto puede no ser una estimación de la longevidad del tejido verde que es comparable con las medidas de las dicotiledóneas descritas con anterioridad. En algunos pastos y taxa relacionados, la lámina continúa generando tejidos nuevos mientras el viejo tejido comienza a envejecer, haciendo que la media de la duración de la lámina completa sea mucho más larga que la duración de una sección particular de la lámina. Debido a esto, la longevidad de la lámina completa no es particularmente significativa como una medida de la longevidad del tejido. En esos casos, la producción y mortalidad de zonas específicas de la lámina pueden ser medidas para estimar la longevidad del tejido, con una adaptación del Método 2 antes descrito.

b) Medición de la duración del follaje verde

Observar el follaje de cinco a diez individuos de una especie dada varias veces a lo largo del año. Recomendamos un censo de todas las especies en el inventario al menos una vez al mes durante la estación favorable (preferentemente incluyendo un censo apenas antes y apenas después de la estación favorable) y, de ser posible, uno en el medio de la estación desfavorable. Los meses en los cuales se estima que las plantas tienen al menos el 20% del follaje potencial en su

pico estacional se interpretan como meses “verdes”. Estos censos pueden combinarse con mediciones de longevidad de las hojas. La mayoría de las especies con longevidad de las hojas individuales > 1 año estarán verdes a lo largo de todo el año. Nótese que en algunas especies perennifolias de los trópicos, en los cuales no hay estaciones marcadas, la longevidad de las hojas individuales puede ser tan corta como unos pocos meses.

Casos especiales o extras:

- (1) *Plantas áfilas:* Si los tejidos fotosintéticos no mueren y caen como unidades separadas, seguir el Método 1.2 para las zonas específicas de los tejidos fotosintéticos, como se especificó arriba para las monocotiledóneas.

Referencias sobre la teoría, significado y base de datos: Chabot and Hicks (1982); Coley (1988); Reich *et al.* (1992); Aerts (1995); Reich *et al.* (1997); Westoby *et al.* (2000); Wright *et al.* (2002); Reich *et al.* (2004); Wright *et al.* (2004); Poorter and Bongers (2006).

Más sobre métodos: Jow *et al.* (1980); Diemer (1998); Craine *et al.* (1999); Wright *et al.* (2002); Reich *et al.* (2004).

3.9 Densidad de nervaduras

Las redes de nervaduras son las encargadas del transporte de agua, carbono y nutrientes en la hoja. La densidad de las nervaduras y la longitud de las nervaduras menores por unidad de área foliar (mm mm^{-2}) se pueden usar para caracterizar la estructura de estas redes. La densidad de las nervaduras determina la conductancia hidráulica y la tasa fotosintética. Dependiendo del grupo de especies considerado, la densidad de nervaduras puede correlacionarse con otros caracteres foliares, tales como el espesor foliar, la densidad de estomas y la tasa máxima de intercambio de gases. Este carácter muestra plasticidad a lo largo de los ambientes dentro de una especie y es altamente variable entre especies, mostrando tanto tendencias filogenéticas amplias como potenciales adaptaciones a los gradientes de recursos.

Para la medición de este carácter pueden utilizarse hojas frescas o secas (ver protocolo de recolección de hojas en 3.1.). La intensidad del muestreo debe tener en cuenta la variación conocida entre las hojas al sol y a la sombra, y a lo largo de la lámina de hojas determinadas. Si es posible, las mediciones deben hacerse en las secciones de la lámina que no contienen venas grandes. Para hojas más pequeñas, usar la hoja entera, Para hojas más grandes, una sección de 1 cm^2 es suficiente.

Mediciones

Remojar la hoja en 5 % p/v NaOH/H₂O por 24-72 horas o hasta que se vuelva transparente. Si la solución se vuelve

de un color marrón opaco durante el remojo, reemplace la solución de remojo. Luego enjuague la hoja en H₂O y transfiera a una solución al 2% p/v NaOCl/H₂O por 5-30 minutos o hasta que se haya desteñido.

Enjuagar la hoja en H₂O y transferir deshidratando progresivamente a etanol puro (por ej, 30%, 50%, 70%, 100% etanol, cada paso debe durar 30 segundos, para hojas más tiernas; hasta 5 minutos para hojas más duras). Teñir la hoja por 15 minutos en 1% p/v safranina O en etanol y/u otro colorante para ligninas. Desteñir en etanol. Luego la hoja puede ser montada en agua o glicerol en láminas transparentes de plástico, o en preparados permanentes, luego de la transferencia con 100% tolueno, en inmersión con aceite o Permout (luego del montaje dejar el preparado varios días en reposo para permitir la total evaporación del tolueno antes de realizar las mediciones). Las nervaduras aparecerán teñidas en rojo. Previo a la medición asegurarse que todas las nervaduras de la red sean visibles. Las nervaduras menores, que son más numerosas y funcionalmente muy importantes, pueden ser muy difíciles de ver, y a menudo requieren remover la cutícula para una visualización más precisa. El conteo de las nervaduras debe ser hecho utilizando objetivos microscópicos de 4x para helechos y hasta de 40x para angiospermas. Fotografiar la red de nervaduras utilizando una luz microscópica, asegurando un campo de visión lo suficientemente grande (por ej., 1-10 mm^2). Luego medir la longitud total de las nervaduras en la imagen y dividir ese número por el área de la imagen para obtener la densidad de las mismas, utilizando un software de análisis de imagen (ver 3.1). Este proceso de análisis de imagen puede ser semiautomatizado con los softwares libres disponibles (ver Mas sobre metodología más adelante) pero la precisión debe ser testeada.

Casos especiales y extras

- (1) *Manipulación de las hojas.* Las hojas se vuelven delicadas durante el proceso de tinción y montaje, por lo que deben ser manipuladas cuidadosamente entre soluciones. De ser necesario la solución debe ser aspirada del recipiente que la contiene, de forma que no se produzcan perforaciones o desgarros en la lámina. Para mejores resultados, los detalles del protocolo de enjuague de las hojas pueden ser modificados de acuerdo a las características particulares de las diferentes especies. Por ejemplo, se puede utilizar Na tibio (nunca hirviendo), y enjuagar varias veces, y una solución más fuerte de NaCl/H₂O por un período de tiempo más corto. Las hojas pequeñas o delgadas pueden requerir menos tiempo de remojo en todas las soluciones. Por el contrario, hojas muy gruesas o densas pueden requerir varios días en la solución de NaOH antes de volverse transparentes. Las hojas peludas pueden requerir que se remueva la epidermis.

- (2) *Esclereidas*. En algunas especies, las hojas pueden tener esclereidas (que también tienen una función hidráulica muy importante) y que pueden ser confundidas con nervaduras. En estos casos o en otros particulares, puede ser necesaria la medición de caracteres adicionales de nerviación, para investigaciones más detalladas de estructura y función de la hoja (ver referencias más adelante).

Referencias sobre la teoría y significado: Uhl and Mosbrugger (1999); Roth-Nebelsick *et al.* (2001); Sack and Frole (2006); Sack and Holbrook (2006); Brodribb *et al.* (2007); Boyce *et al.* (2009); Brodribb *et al.* (2010).

Más sobre métodos: Dilcher (1974); Gardner (1975); Brodribb and Feild (2010); Price *et al.* (2011).

3.10 Tasa fotosintética en saturación de luz

La tasa fotosintética máxima (i.e. en condiciones de saturación de luz) (A_{\max}) bajo condiciones de campo típicas, es expresada usualmente en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o $\text{nmol g}^{-1} \text{s}^{-1}$, o ambas. A_{\max} es un carácter valioso como medida (o al menos como índice) de la capacidad metabólica y es un factor que determina en el promedio de la tasa fotosintética alcanzada (para el follaje superior de la copa). A_{\max} se relaciona con otros aspectos estructurales, químicos y de longevidad del espectro de la economía de las hojas y, junto con esas otras variables, puede permitir predecir procesos de la copa a nivel ecosistémico. Típicamente se hacen medidas simultáneas de la conductancia del vapor de agua de la hoja al mismo tiempo que las mediciones de fotosíntesis.

¿Qué, cuándo y cómo realizar las mediciones?

Se recomienda realizar las mediciones sobre hojas jóvenes y totalmente expandidas (Ver 3.1). Éstas deben provenir de las partes iluminadas de la copa, salvo que se esté enfocando la investigación en taxones del sotobosque. Medir las hojas solamente si han estado expuestas a la luz suficiente tiempo justo antes de realizar las mediciones (por ej. sol directo por 5-10 minutos) para minimizar los recaudos sobre el estatus de inducción foliar o el cierre de estomas debido a la sombra (Ver 3.1. por más discusión).

Dado que la fotosíntesis real es menor que la máxima debido a numerosos factores (incluyendo bajas o altas temperaturas, humedad del suelo o del aire limitadas, potencial de agua en las hojas negativo e inhibición fuente-sumidero, entre otras), se debe ser cuidadosos al elegir el momento del año, hora del día y condiciones generales bajo las cuales hacer las mediciones. Es esencial tener algún conocimiento sobre las respuestas al intercambio de gases del taxón en estudio.

No haga mediciones durante o justo después de períodos (días a semanas) de déficit de agua severo o temperaturas

inusuales. Lo ideal es realizar las mediciones en días donde la humedad del suelo, el estatus de agua de la planta, la humedad del aire, la irradiación y las temperaturas están cerca del óptimo para el taxón en cuestión. Las mediciones en la mayoría de los ecosistemas deben ser hechas a media mañana o hacia el final de la mañana (8- 11 hora local) bajo temperaturas o déficit de presiones de vapor que no sean limitantes. Esto minimiza el riesgo de muestrear durante el medio día o en la tarde, cuando disminuye la tasa de intercambio de gases debido al cierre de los estomas, la inhibición fuente-sumidero u otras causas. Si una determinada mañana, o las mañanas en general, son frías en relación a la temperatura óptima para la fotosíntesis, las mediciones se pueden hacer más tarde durante el día. Como la mayoría de las mediciones publicadas han sido realizadas bajo concentraciones de CO_2 ambientales, sería recomendable hacer lo mismo. Si las tasas pueden también ser calculadas bajo niveles de saturación de CO_2 , también es de utilidad.

Cualquier sistema de medición de intercambio de gases foliares confiable puede ser usado para realizar las mediciones. Las condiciones de la cámara pueden ser establecidas en los niveles considerados óptimos, o bien se pueden dejar las condiciones *in situ* (que necesitan ser cercanas a las óptimas). Si es posible, medir el follaje intacto o las hojas sobre las ramas cortadas y luego recortadas bajo el agua. En este último caso, controlar si hay individuos que no logran permanecer hidratados. Para corroborar que la técnica funciona adecuadamente para el taxón estudiado haga una comparación de intercambio de gases en ramas intactas y en ramas “recortadas”. Las mediciones pueden ser también realizadas en hojas sueltas, pero en este caso las hojas deben ser medidas dentro de segundos a unos pocos minutos como máximo, después de su desprendimiento. También en este caso se debe realizar una prueba de medición sobre hojas intactas vs. hojas sueltas, en una submuestra, para asegurarse que las tasas observadas son similares. Si es posible, el material foliar dentro de la cámara debe ser colectado (Ver 3.1.), medido para CMSF y AFE, y almacenada para análisis químicos subsiguientes.

Referencias sobre la teoría, significado y bases de datos: Reich *et al.* (1992); Reich *et al.* (1997); Reich *et al.* (1999); Wright *et al.* (2004).

Más sobre métodos: Wong *et al.* (1979 and 1985 a-c); Reich *et al.* (1991a, b); Ellsworth and Reich (1992).

3.11 Respiración foliar en oscuridad

La caracterización de la respiración foliar en oscuridad (R_{hoja}), de una manera que permita comparaciones entre especies y especialmente entre sitios y momentos del año es un desafío, dada la sensibilidad y la necesidad térmica que posee la R_{hoja} . Sin embargo la medición de R_{hoja} bajo condiciones

de campo típicas es valiosa porque es una medida del metabolismo basal y un estimador aproximado del promedio de flujo efectivo de carbono respiratorio nocturno. La R_{hoja} se relaciona con otros aspectos metabólicos, estructurales, químicos y de longevidad del espectro de la economía de la hoja y junto con esas otras variables, permite estimar procesos que ocurren a escala de la copa en general y/o de los ecosistemas enteros.

¿Qué, cuándo y cómo tomar las mediciones?

Muestrear hojas jóvenes o de mediana edad pero totalmente expandidas (Ver 3.1) para evitar medir la respiración asociada con la biosíntesis (*growth respiration*) No realizar mediciones durante o inmediatamente después condiciones atípicas (estrés por calor o frío, estrés hídrico, etc.) a menos que la respuesta a esos factores sea el foco de la investigación. Tomar las muestras de hojas de sectores de la copa expuestas al sol durante el día, a menos que la vegetación bajo estudio pertenezca a un grupo taxonómico que se encuentre en las partes sombreadas del sotobosque (pero también ver Casos especiales y extras en 3.1.). Si es posible, medir las hojas intactas durante la noche. En cualquier caso las hojas deben haber estado en la oscuridad por alrededor de 30 minutos previos a la medición para minimizar la variación debido a fotosintetatos fijados muy recientemente o a pérdidas de CO_2 respiratorio inducidas por luz efímera.

Para realizar estas mediciones se puede usar cualquier sistema de intercambio de gases foliares confiable con el que sea posible controlar la temperatura de la hoja. De ser posible, medir hojas sin desprenderlas de la planta. Si esto no fuera posible, la alternativa es medir hojas sueltas frescas, mantenidas en humedad y en la oscuridad (para minimizar pérdidas de carbono y agua) hasta realizar las mediciones. De ser posible, realizar pruebas de hojas sin desprender vs. sueltas en una submuestra para asegurar que las tasas observadas sean similares (Ver en 3.10 por manipulación de hojas).

La R_{hoja} puede ser medida sobre el mismo material en el que se mide la tasa fotosintética (ver 3.10) simplemente apagando, o cerrando la cámara completamente a la luz incidente (y esperando al menos 30 minutos). Sin embargo, las tasas de flujo para R_{hoja} son aproximadamente un orden de magnitud menores que la A_{max} y por eso la relación entre la señal y el ruido de los sistemas portátiles de medición de fotosíntesis pueden ser subóptimos para taxa con tasas de flujo más bajas. Se puede reducir las tasas de flujo y/o incrementar la cantidad de hojas en la cámara para disminuir este problema, pero esto no siempre es suficiente para obtener mediciones confiables. En este último caso se pueden realizar las mediciones mediante cámaras especializadas (que pueden resistir más cantidad de hojas) y/o eligiendo una temperatura

estándar lo más alta posible, dentro del rango (próximo párrafo), para disminuir el problema incrementando la tasa de flujo.

Usualmente las mediciones de R_{hoja} se realizan a temperaturas estándar típicas del sitio de crecimiento de la especie en estudio (por ej. 25°C en los trópicos, 20°C en zonas templadas, 10 o 15°C en fríos boreales o tundra). Sin embargo, muchas veces se realizan también comparaciones de taxa que crecen en diferentes ambientes bajo diferentes temperaturas. En estos últimos casos, las funciones de respuestas a temperaturas instantáneas pueden ayudar a evaluar la respiración a lo largo de diferentes regímenes de temperatura. Para ello, cuando sea posible, se recomienda medir submuestras de hojas a temperaturas diferentes, por ejemplo con intervalos de 10°C, o, idealmente a cuatro temperaturas diferentes dentro de un rango de 15 a 35°C

Referencias sobre la teoría, significancia y bases de datos: Reich *et al.* (1998); Tjoelker *et al.* (2001); Wright *et al.* (2004); Atkin *et al.* (2005); Reich *et al.* (2008); Rodríguez-Calcerrada *et al.* (2010).

3.12 Vía metabólica fotosintética

En las plantas terrestres operan tres vías metabólicas fotosintéticas principales, cada una con sus particularidades bioquímicas: C_3 , C_4 y CAM (Metabolismo ácido de las Crasuláceas, CAM por sus siglas en inglés). Estas vías metabólicas tienen consecuencias importantes para las temperaturas óptimas de fotosíntesis (más altas en plantas C_4 que en C_3 por ejemplo), para la eficiencia de uso de agua y nutrientes, y para la respuesta a elevadas concentraciones de CO_2 . En comparación con las plantas C_3 las plantas C_4 tienden a ser más abundantes en ambientes cálidos, soleados y relativamente secos y/o salobres (por ej. en ecosistemas similares a sabanas tropicales). Las plantas CAM, por su parte, son generalmente muy conservadoras con el agua y se desarrollan predominantemente en ecosistemas secos y cálidos. Algunas plantas acuáticas sumergidas son CAM también. Hay especies que son CAM obligadas y otras que son facultativas, estas últimas pueden cambiar entre C_3 y CAM dependiendo de factores ambientales (por ej. orquídeas epífitas en selvas de altura australiana).

Hay dos métodos principales de identificación de la vía metabólica fotosintética disponibles: la composición de isótopos de carbono y las observaciones anatómicas. Además, se puede confirmar que una planta es CAM de forma muy económica verificando que los estomas están abiertos de noche y cerrados durante el día, o midiendo patrones diurnos de ácidos orgánicos o valores de pH foliares. Qué método elegir (una combinación sería lo más confiable) depende de las facilidades o fondos disponibles, así como del objetivo del trabajo (por ej, para contrastar C_4 vs. C_3 , o CAM vs C_3). Aun cuando la composición de isótopos de carbono puede

estar afectada por factores ambientales, las diferencias intraespecíficas genéticas y/o condiciones fenológicas, la variabilidad intraespecífica es lo suficientemente pequeña como para no interferir con la distinción entre las vías metabólicas C_4 and C_3 . En muchas familias de plantas, sólo se encontró el metabolismo C_3 . Es de utilidad entonces saber en qué familias se han encontrado C_4 y CAM. Las especies de esas familias pueden ser escaneadas sistemáticamente como potenciales candidatos para estas vías metabólicas (Ver *Material Suplementario 4*, Tabla 1). Más abajo describimos dos métodos que combinados proveen buen contraste entre tipos de vías metabólicas.

¿Qué recolectar y cómo hacerlo?

Recolectar las hojas totalmente expandidas o las estructuras fotosintéticas de plantas adultas, saludables y creciendo a plena luz del sol o tan cerca de la luz plena como sea posible. Recomendamos muestrear al menos tres hojas de tres individuos de tres plantas. Si se va a llevar a cabo análisis anatómicos (ver en B: Análisis anatómicos), almacenar al menos parte de las muestras frescas (ver 3.1)

(A) Análisis de isótopos de Carbono

Almacenamiento y procesamiento

Secar las muestras inmediatamente después de la recolección (ver protocolo en sección 3.1). Una vez seca, la muestra puede ser almacenada por largos períodos de tiempo sin que afecte su composición de isótopos. Si esto no es posible, la muestra podría ser almacenada primero en una atmósfera fría y húmeda (Ver 3.1.) o se puede colocar en el microondas y luego secar tan rápido como sea posible a 70-80°C para evitar pérdida de materia orgánica a través de la respiración foliar o descomposición microbiana. Las muestras pueden ser recolectadas de una porción de un espécimen de herbario, pero este procedimiento no es el más recomendado. Hay que tener en cuenta que los insecticidas y otras sustancias que puedan haberse utilizado para preservar el espécimen pueden afectar su composición isotópica.

Pesar las hojas o tejidos para cada planta, luego moler los tejidos secos cuidadosamente y pasarlos por un tamiz de 40 μm o más fino. A menudo es más fácil, si la muestra es muy pequeña, moler todo el material con un mortero de mano. Se necesitan sólo pequeñas cantidades de tejido para el análisis de isótopos de carbono. En la mayoría de los casos se utiliza menos de 3 mg de materia orgánica seca.

Mediciones

Los índices de isótopos de carbono en materia orgánica ($\delta^{13}\text{C}_{\text{hoja}}$) son medidos utilizando un espectrómetro de masa (IRMS, por sus siglas en inglés, con precisión entre 0,003

% y 0,3 %, dependiendo del tipo de IRMS utilizado) y son tradicionalmente expresados en relación con el PDB estándar como $\delta^{13}\text{C}$ en unidades de por mil (‰), es decir partes por mil. Después de los análisis de isótopos, la vía metabólica fotosintética de las especies puede ser determinada basándose en lo siguiente (ver explicación gráfica en *Material Suplementario 4*, Figura 1)

Fotosíntesis C_3	$\delta^{13}\text{C}$: -21 to -35 ‰
Fotosíntesis C_4	-10 to -14 ‰
CAM facultativa	-15 to -20 ‰
CAM obligada	-10 to -15 ‰

Debe tenerse en cuenta que separar plantas C_3 o C_4 de CAM basándose sólo en $\delta^{13}\text{C}$ es difícil (para plantas CAM facultativas los valores de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados son de un rango tan amplio como de 14 a -23). Sin embargo, como regla general, si $\delta^{13}\text{C}$ es entre -10 y -23‰, y el tejido fotosintético es suculento o las concentraciones de ácidos orgánicos son altos durante la noche, pero bajos durante el día, entonces asumimos que la planta es CAM. En esos casos serían decisivas observaciones anatómicas y mediciones diurnas de intercambio de gases o análisis bioquímicos (ver B. *Análisis anatómicos*).

(B) Análisis anatómicos

Las plantas C_3 y C_4 generalmente muestran diferencias consistentes en anatomía foliar, que se ven mejor en un corte transversal. Usando una hoja de afeitar o micrómetro, haga cortes transversales de las láminas de al menos tres individuos por especie, asegurándose de incluir algunas nervaduras regulares (las particularmente gruesas y prominentes, incluyendo la nervadura principal y las laterales más gruesas, no son relevantes). Las plantas C_3 tienen hojas en donde, por lo general, todos los cloroplastos son esencialmente similares en apariencia y están distribuidos por todo el mesófilo (tejidos fotosintéticos). Las células del mesófilo no están concentradas alrededor de las nervaduras y usualmente están organizadas en "empalizada" o estratos "esponjosos" paralelos a, y respectivamente adyacentes a, las epidermis superior e inferior (Ver *Material Suplementario 4*, Figura 2). Verticalmente, las hojas de las plantas C_3 a menudo tienen un estrato en palizada adyacente a cada epidermis y un estrato esponjoso entre las dos palizadas. Las células que rodean directamente las nervaduras (estructuras de transporte con floema de paredes delgadas y generalmente con células del xilema con paredes más gruesas), llamadas vaina vascular/haz vascular?, normalmente no tienen cloroplastos. Las plantas C_4 en contraste, exhiben típicamente la "anatomía Kranz". Concretamente, las nervaduras están rodeadas por un estrato distintivo de vainas vasculares (*Material Suplementario 4*, Figura 2) que suelen tener pared celular gruesa y tienen cloroplastos abundantes, a menudo agrandados, que contienen grandes gránulos de almidón.

Las células del mesófilo están usualmente concentradas alrededor de las células de la vaina vascular, a menudo como un estrato simple cuyas células están orientadas radialmente en relación al centro de la nervadura, y contienen cloroplastos más pequeños sin gránulos de almidón. Estas diferencias pueden ser usualmente identificadas de manera sencilla bajo un microscopio de luz común. Muchos textos de fisiología y anatomía presentan ilustraciones más detalladas de anatomía Kranz vs anatomía C_3 (Ver *Más sobre métodos* abajo).

Si se observa anatomía Kranz, la especie es C_4 . En caso contrario, es posible que sea C_3 , a menos que la planta sea particularmente suculenta y pertenezca a alguna de las familias descritas como posibles CAM. En este último caso pueden ser clasificadas como (posible) CAM. Muchas hojas CAM no tienen la empalizada de mesófilo esponjoso típicos de las plantas C_3 , sino sólo un estrato delgado de cloroplastos más o menos isodiamétricos justo debajo de su epidermis. En esos casos todo el centro de la hoja consiste en células parenquimáticas incoloras, grandes, de paredes delgadas que almacenan agua y ácidos orgánicos. En las plantas CAM los ácidos orgánicos (mayormente ácido málico) se acumulan durante la noche, y se degradan durante el día para proveer de CO_2 para la fotosíntesis foliar, las especies CAM muestran un pH claramente más bajo después de la noche en comparación con la tarde. Debido a esto si las plantas vivas son de fácil acceso es recomendable evaluar el pH de una muestra de hojas frescas recolectadas al atardecer y luego machacadas en agua (ver 3.5), y repitiendo el procedimiento sobre la misma población en una nueva muestra recolectada antes del amanecer. Adicionalmente, las tasas de los isótopos de carbono pueden darnos más evidencia para distinguir entre CAM y metabolismos C_3 o C_4 (ver *A. Análisis de isótopos de Carbono*).

Casos especiales o extras

- (1) *Preparados permanentes* o fotografías y visibilidad de cloroplastos. Existen numerosos métodos para hacer preparados microscópicos permanentes. Debe tenerse en cuenta que algunos de esos métodos pueden resultar en una pobre visibilidad de los cloroplastos. Un método para retener el color verde de los cloroplastos es remojar la planta o las hojas en una solución de 100 g de $CuSO_4$ en 25 ml de formaldehído alcohol al 40 %, 1000 ml de agua destilada y 0.3 ml 10 % H_2SO_4 por dos semanas, luego en 4% formaldehído alcohol por una semana y enjuagar posteriormente con agua corriente por 1- 2 horas y almacenar en formaldehído alcohol hasta su uso. Sin embargo, el material tratado de esta forma puede ser seccionado solamente utilizando un micrótopo luego de incluirlo o congelarlo, en cambio, muchas hojas vivas, turgentes pueden ser seccionadas a mano alzada utilizando técnicas adecuadas como seccionar una hoja enrollada o una pila de muchas

hojas. Las fotomicrografías de preparados de secciones frescas son una forma alternativa de mantener los registros para mediciones futuras.

Referencias sobre la teoría, significado y bases de datos: O'Leary (1981); Farquhar *et al.* (1989); Earnshaw *et al.* (1990); Ehleringer *et al.* (1997); Lüttge (1997); Zott and Ziegler (1997); Wand *et al.* (1999); Pyankov *et al.* (2000); Sage (2001); Hibberd and Quick (2002).

Más sobre métodos: Farquhar *et al.* (1989); Ehleringer (1991); Hattersley and Watson (1992); Mohr and Schopfer (1995); Belea *et al.* (1998); Pierce *et al.* (2002); Taiz and Zeiger (2010).

3.13 Composición de isótopos de carbono como medida de la eficiencia intrínseca en el uso de agua

La absorción del CO_2 mediante los estomas inevitablemente conduce a una pérdida de agua. La magnitud relativa de la fotosíntesis comparada con la de la transpiración depende de muchos factores fisiológicos, morfológicos y ambientales, tanto que diferentes especies en diferentes condiciones de crecimiento pueden tener amplias diferencias en el carbono incorporado por unidad de agua perdida. Esta cantidad, la relación entre las tasas de fotosíntesis neta y la transpiración (=Eficiencia de uso del agua, EUA), es de gran interés ecológico y puede ser medido a escalas de tiempo cortas o largas.

A escalas de tiempo cortas (=instantáneas) la EUA suele ser medida mediante análisis de gas infrarrojo (Ver 3.10). Sin embargo, la EUA instantánea de una hoja puede variar considerablemente en un período de tiempo corto, por ejemplo, debido a intensidad de luz variable y a déficit de presión de vapor. Para estudios comparativos, recomendamos tener en cuenta las precauciones señaladas en 3.10. y calcular la "EUA instantánea intrínseca", que es la relación entre la fotosíntesis neta y la conductancia estomática. Esta métrica excluye el efecto de las diferencias en presión de vapor sobre las tasas de transpiración. Como el CO_2 y el vapor de agua comparten las vías de difusión estomática, pero la difusión del agua es 1,6 veces más rápida que la del CO_2 , la EUA intrínseca se relaciona con el gradiente de CO_2 de la siguiente manera:

$$EUA \text{ intrínseca} = A/g_s = (c_a - c_i) / 1,6 = c_a (1 - c_i/c_a) / 1,6$$

Donde A es la fotosíntesis neta, g_s es la conductancia estomática, c_a y c_i son las fracciones de moles de CO_2 en el aire ambiental y en la cavidad subestomática respectivamente.

Para estudiar la EAU a escalas de tiempo más largas, el abordaje con los isótopos de carbono ha demostrado ser extremadamente útil. Las enzimas fotosintéticas discriminan contra el isótopo estable ^{13}C (en relación a ^{12}C) durante la fotosíntesis, entonces el carbono en las hojas está siempre

empobrecido en ^{13}C en relación al presente en la atmósfera. El grado de la discriminación de las enzimas contra el ^{13}C depende de c_i . Si c_i es bajo en relación a c_a entonces el aire dentro de la hoja se enriquece en ^{13}C y la habilidad de la enzima para discriminar disminuye. Como resultado, la planta fija una mayor proporción de ^{13}C comparada con la fotosíntesis de la planta a c_i más altas. En su forma más simple, para plantas C_3 ,

$$\Delta = a + (b-a) c_i/c_a,$$

Donde Δ es discriminación fotosintética contra ^{13}C , $a=4,4\%$ and $b=27\%$. Por lo tanto, el cálculo de Δ permite estimaciones de c_i/c_a integradas en el tiempo y de esta manera de la EUA intrínseca a escalas de tiempo largas. Nótese que Δ se calcula desde $\delta^{13}\text{C}$ (ver 3.12.): $\Delta = (\delta^{13}\text{C}_{\text{aire}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{planta}}) / (1 + \delta^{13}\text{C}_{\text{planta}})$. Esto implica que es imprescindible asumir o medir la composición de isótopos del aire.

¿Qué y cómo recolectar?

Para la estimación de la EUA intrínseca usualmente se determina $\delta^{13}\text{C}$ de las hojas, pero esa relación se puede determinar en cualquier parte de la planta, por ejemplo en los anillos de crecimiento de los árboles, para registros históricos. Hay que tener en cuenta que, en general, existe fraccionamiento en otros órganos además de las hojas, lo cual lleva a que todos los órganos no-fotosintéticos sean más ricos en ^{13}C que las hojas. Esto permite la diferenciación entre condiciones de crecimiento utilizando anillos de árboles de diferentes edades. El muestreo debe considerar que las hojas que crecieron en diferentes años o diferentes estaciones pueden tener Δ diferentes. Al mismo tiempo, las hojas en diferentes posiciones en un árbol o en una copa pueden variar en Δ por diferencias en apertura estomática y capacidad fotosintética, pero también debido a diferencias en la composición isotópica del aire. Si bien como se dijo antes, para estimar Δ se necesita conocer la composición isotópica del aire, en lugares de libre circulación del aire, tales como la parte superior de una copa, es razonable asumir que la composición isotópica del aire es constante e igual a la de la parte inferior de la atmósfera ($\delta^{13}\text{C}_{\text{aire}} \approx -8\%$).

Almacenamiento y procesamiento

Las muestras deberán ser secadas tan pronto como sea posible luego de su recolección y ya secas deben ser finamente molidas. Luego de ser molidos los tejidos deben ser cuidadosamente tamizados (tamiz de 40 μm o más fino). Los análisis del índice de isótopos de carbono requieren pequeñas muestras (2-5 mg), pero se recomienda recolectar y moler cantidades más grandes de tejido para asegurar representatividad.

Mediciones

Ver 3.12 para medir concentraciones de isótopos de carbono.

Casos especiales o extras

- (1) *Extractos de celulosa.* Los isótopos a veces son analizados utilizando extractos de celulosa para evitar la variación introducida por la composición de isótopos levemente diferente de otros compuestos de carbono. En la mayoría de los casos, sin embargo, los valores de Δ de todo el tejido y los de celulosa se relacionan muy bien.
- (2) *Supuestos.* Reiteramos aquí que la estimación de EUA intrínseca a partir de la composición de isótopos de carbono involucra un número de supuestos. Debido a estola EUA intrínseca no necesariamente se correlaciona bien con la EUA instantánea (relación entre fotosíntesis y transpiración). En ese sentido la conductancia del mesófilo es una complicación particular. Finalmente, debe tenerse en cuenta que la ecuación para Δ que presentamos anteriormente es una simplificación de la teoría. Es también importante notar que, debido a sus diferencias bioquímicas, la ecuación que presentamos para Δ no aplica a plantas C_4 o CAM, y que en estos grupos la composición de isótopos de carbono no es de utilidad para estimar la EUA intrínseca.

Referencias sobre la teoría, significado y bases de datos: Farquhar *et al.* (1989); Cernusak *et al.* (2009).

Más sobre métodos: Ehleringer and Osmond (2000); Seibt *et al.* (2008); Diefendorf *et al.* (2010).

3.14 Pérdida de electrolitos como indicador de la sensibilidad a las heladas

La cantidad de electrolitos que se pierden luego de que la hoja ha sufrido congelamiento es un indicador de la sensibilidad de un tejido las heladas y está relacionada con el clima en el cual la especie se desarrolla. Las hojas de las especies que habitan regiones cálidas, y/o que crecen en los sitios más cálidos a lo largo de un marcado gradiente climático regional, exhiben hojas con una mayor sensibilidad a las heladas, que aquellas especies de regiones más frías, y/o que crecen en los ambientes más fríos a lo largo de un gradiente regional. La técnica aquí descrita está basada en la idea de que cuando una célula o tejido experimenta un marcado estrés térmico, uno de los primeros síntomas que manifiesta es la disrupción de la permeabilidad de las membranas celulares, eliminando la capacidad de las células de retener solutos, tales como los iones. La pérdida de iones desde un tejido puede ser fácilmente evaluada, a través de la medición de los cambios en la conductividad de electrolitos de una solución que baña a los tejidos. La técnica es aplicable a un amplio rango de tipos de hojas (desde hojas tiernas a esclerófilas), taxa

(monocotiledóneas, dicotiledóneas, etc.) y, no se ve afectada por el espesor de la cutícula.

¿Qué recolectar y cómo hacerlo?

Recolectar hojas jóvenes, maduras, con la mayor exposición solar posible, sin signos de herbivoría o daños producidos por patógenos (ver 3.1). Cuando la recolección se torna más complicada, la respuesta dependerá de la pregunta a responder, aunque en la mayoría de los casos la recolección debería estar estandarizada para todas las taxa considerados en esta medición. Dependiendo de la pregunta de interés, recolectar las hojas durante el pico de la temporada de crecimiento (ver 3.1.), o preferentemente cerca del fin de la temporada (ver *Casos especiales o extras*) o en invierno (para especies perennifolias).

Si una especie crece a lo largo de un gradiente ambiental amplio, y el objetivo es una comparación interespecífica, las hojas deberían ser recolectadas en el sitio donde la especie es más abundante (ver sección 1.1). Además, si el estudio contempla comparar muchas especies, es conveniente recolectar las muestras en el menor intervalo de tiempo posible, para minimizar diferencias debido a la aclimatación que pueden presentar las hojas como consecuencia de cambios en las condiciones meteorológicas que pueden ocurrir en días o semanas. Recolectar hojas de al menos cinco individuos adultos, elegidos al azar, por cada especie.

Almacenamiento y procesamiento

Las hojas recolectadas deben ser almacenadas en una conservadora o heladera hasta que sean procesadas en el laboratorio (ver 3.1.). Con la finalidad de minimizar los procesos naturales de senescencia, las muestras deben ser procesadas el mismo día de su recolección. Por cada planta, con un sacabocado, obtener cuatro discos foliares de 5 mm de diámetro, evitando las venas principales. A los discos foliares se les aplicaran dos tratamientos distintos, utilizando dos discos foliares en cada uno (ver más abajo en este protocolo). En el caso de hojas aciculares, cortar fragmentos del tejido fotosintéticamente activo que sumen un área foliar similar a los disco de 5 mm de diámetro. Las muestras deben ser enjuagadas durante 2 horas en agua destilada en un agitador. Luego, secar dos discos (o su equivalente en fragmentos de área foliar) y sumergirlos en un tubo Eppendorf con un 1 ml de agua destilada. Es importante que los discos estén completamente sumergidos. Para cada tratamiento, preparar tantas replicas como el número de plantas recolectadas (1 replica equivale a 2 tubos, en el cual, cada uno contiene 2 discos o su equivalente en fragmentos de hojas).

Mediciones

Aplicar los siguientes tratamientos, sin aclimatación previa, a las dos muestras de disco o fragmentos de hojas en los respectivos tubos: (1) tratamiento control: incubar a 20°C (o a temperatura ambiente, lo más estable que sea posible); y (2) tratamiento de congelamiento: incubar a -8°C (en un congelador calibrado). Las incubaciones deberían realizar durante 14 horas en completa oscuridad, para evitar alguna reacción inducida por la luz.

Después de la incubación, dejar que las muestras alcancen temperatura ambiente y medir la conductividad de la solución. Para medir la conductividad se debe tomar una muestra de la solución del tubo Eppendorf y colocarla en un medidor de conductividad estándar, previamente calibrado, como el Horiba C-172®. Luego, registrar la conductividad de la solución. A continuación, sumergir los tubos Eppendorf, de ambos tratamientos, en agua hirviendo durante 15 minutos, con la finalidad de desnaturizar las membranas celulares y liberar todos los solutos en la solución del tubo Eppendorf. Finalmente, volver a medir la conductividad. Antes de la inmersión, perforar la tapa de cada uno de los tubos Eppendorf, para que se pueda liberar la presión durante la ebullición.

Cálculos:

1. Porcentaje de fuga de electrolitos (PEL): en cada una de las plantas calcular, para el control y el tratamiento de congelamiento:

$$PEL = (e_s / e_t) \times 100$$

Donde e_s , es la conductividad de una muestra inmediatamente después del tratamiento y, e_t es la conductividad después de hervir la muestra. Altos valores de PEL indican una desnaturización significativa de las membranas y, por lo tanto, daño celular. Mientras mayor sea PEL, mayor es la sensibilidad de las hojas medidas al congelamiento.

2. PEL corregido: los valores de PEL del tratamiento control pueden variar entre especies como consecuencia de diferencias intrínsecas en la permeabilidad de las membranas, la manipulación experimental y de las lesiones celulares resultantes de la obtención de los discos o los fragmentos de hojas. Para controlar estas y otras posibles fuentes de error, a cada una de las réplicas, se debe restar el PEL del tratamiento control al tratamiento de congelamiento. De ahí que el PEL corregido sea:

$$PEL \text{ corregido} = PEL \text{ del tratamiento de congelación} - PEL \text{ del tratamiento control}$$

Para el cálculo de la media, desvío estándar o error estándar, de cada una de las especies, el PEL corregido

obtenido de cada una de las plantas es considerado como una unidad de observación estadística o replica.

Casos especiales o extras

- (1) Aplicación a diferentes formas de vida o formas de crecimiento: La técnica aquí descrita no es aplicable a plantas halófitas y suculentas. Además, esta técnica no necesariamente es aplicable a plantas deciduas o hemicriptofitas, ya que sus adaptaciones para tolerar las heladas se relacionan con la anatomía del leño y la producción de botones foliares, más que con adaptaciones de las hojas. En estos últimos casos?, la fuga de electrolitos posiblemente podría ser evaluada tomando secciones de los tallos, aunque la fiabilidad de este método no ha sido todavía evaluada, hasta nuestro conocimiento, como lo ha sido en hojas.
- (2) Temporada de recolección. Debido a que existe una aclimatación a las bajas temperaturas a medida que las temperaturas descienden, es recomendable realizar la recolección de las hojas cerca o al final de la temporada de crecimiento.
- (3) Aclimatación. La ocurrencia de aclimatación en respuesta a heladas moderadas podría ser detectada utilizando la técnica aquí descrita, con el tratamiento a -8°C , con hojas recolectadas en sucesivas fechas entre verano y otoño.
- (4) Sensibilidad a altas temperaturas. Para estimar la sensibilidad a altas temperaturas inusualmente altas (ca. 40°C), se puede usar la misma técnica básica, con una modificación en el tratamiento con temperatura.
- (5) Sensibilidad al frío. Ésta es una limitante fisiológica con importancia ecológica en ambientes montañosos de bajas latitudes, la cual podría ser detectada mediante el uso de esta técnica con un pequeño ajuste de la temperatura de tratamiento. Se recomienda realizar una incubación durante 24hs o más, a alrededor de $+5^{\circ}\text{C}$, por ej. en una heladera común. En su defecto, se podría utilizar un baño de agua destilada (o agua de lluvia) a 0°C , ya que esta técnica no congelaría realmente los tejidos vegetales. Un tejido con sensibilidad al frío liberaría electrolitos después de la incubación, mientras que uno tolerante al frío no lo haría.

Referencias sobre teoría, significado y bases de datos: Levitt (1980); Blum (1988); Earnshaw *et al.* (1990); Gurvich *et al.* (2002).

Más bibliografía sobre métodos: Earnshaw *et al.* (1990); Gurvich *et al.* (2002).

3.15 Potencial hídrico foliar como una medida del estatus hídrico de la planta

Frente a la escasez de agua en el suelo algunas especies pueden tolerar cierto grado de estrés hídrico de diferentes maneras, evitándolo o tolerándolo. Por ejemplo, para evitar o minimizar el estrés hídrico, las especies pueden dejar caer sus hojas en los períodos de estrés, o pueden poseer un enraizamiento profundo para retrasar la evolución del estrés hídrico en sus tejidos, también pueden cerrar sus estomas y así el agua almacenada en sus tejidos se pierde más lentamente a través de la cutícula. Alternativamente, los tejidos pueden tolerar una desecación fisiológica. El potencial hídrico foliar (YL; unidades -MPa) es un indicador del estado hídrico de la planta. , mientras más negativo sea el valor, mayor es la desecación foliar.

Dado que las plantas pueden equilibrar su potencial hídrico con el del suelo durante la noche, la medición de potencial hídrico foliar antes del amanecer podría representar el potencial hídrico del suelo, en la zona cercana a la rizósfera. No obstante, algunos trabajos han demostrado recientemente que existe un desequilibrio significativo entre el potencial hídrico antes del amanecer y el potencial hídrico del suelo. Algunos de los mecanismos involucrados en este desequilibrio son: la transpiración nocturna, la cavitación del xilema y la acumulación de osmolitos en las paredes celulares. Debido a esto el potencial hídrico antes del amanecer podría ser más negativo que el potencial hídrico del suelo y, por ello solo debería ser utilizado como una aproximación a la disponibilidad del agua en el suelo.

Durante el día, a medida que las plantas transpiran hacia la atmosfera, el potencial hídrico foliar disminuye por debajo del potencial hídrico del suelo. Durante la temporada seca, el potencial hídrico foliar medido al mediodía es considerado un buen indicador del grado de desecación que experimenta una planta mientras mantiene su actividad normal. Por lo tanto, el valor mínimo en el potencial hídrico que una planta puede alcanzar (potencial hídrico mínimo), usualmente al medio día, en la época del año más seca y calurosa, puede ser utilizado como un indicador de la tolerancia al déficit hídrico que una especie (o individuos y poblaciones) puede soportar (asumiendo que las plantas están todavía sanas y no están afectadas por la sequía).

¿Qué recolectar y cómo hacerlo?

En general, las mediciones del potencial hídrico foliar mínimo deben ser realizadas al final de la temporada seca y cálida en las especies perennifolias y en los ecosistemas mediterráneos, en los que las lluvias son en invierno. En los sistemas con lluvias estivales, el momento del año con mayor estrés hídrico puede no ser obvio. Sin embargo, en los ecosistemas, con lluvias en la temporada cálida, la época del año en la cual, el estrés hídrico es máximo, puede no ser tan obvio. En particular en estos últimos casos, la realización de

mediciones repetidas en distintas estaciones del año pueden ayudar a encontrar el potencial hídrico foliar mínimo real para distintas especies.

Dependiendo del tipo de bomba de presión utilizada (ver más abajo en este mismo protocolo), se deberían recolectar hojas o pequeñas ramas terminales con hojas. Las muestras deberían ser recolectadas al medio día y, como se ha indicado previamente (ver 3.1.), de ramas o individuos ubicados al sol. Antes de la recolección, las hojas deben estar expuestas a sol directo, por lo menos durante 30 minutos (deben evitarse los días nublados). Las muestras deben ser medidas en el menor tiempo posible o, en su defecto, dentro de la media hora luego de recolectar todas las muestras. En general, no debería pasar más de un periodo de media hora entre la primera muestra recolectada y la última medida. El número de muestras a recolectar dependerá de las bombas de presión disponibles. Las muestras deberían ser almacenadas dentro de bolsas de plástico herméticas, dentro de las cuales uno puede exhalar una bocanada de aire con la finalidad de aumentar la humedad y el CO₂; y de esta forma minimizar la transpiración de las hojas o pequeñas ramas. Las muestras almacenadas herméticamente en bolsas de plástico deberían mantenerse refrigeradas y a la oscuridad (por ej. en una heladera para picnic o en una heladera eléctrica portátil, con aislación y con hielo).

Mediciones

La forma más simple de medir el potencial hídrico foliar es utilizando una bomba de presión o bomba de Scholander (ver diagrama de la Fig. 4). Este dispositivo consiste en una cámara que contiene la presión, en la cual se introduce la muestra (una hoja o una rama pequeña con hojas); un manómetro o algún artefacto que mide la presión dentro de la cámara y una fuente de presión (en general un tanque de presión de nitrógeno) conectada a la cámara a través de una válvula. En el mercado pueden conseguirse diferentes modelos de este tipo de bombas.

Para realizar la medición, se coloca en la cámara una hoja, o una pequeña rama con hojas, con el extremo por el cual se cortó hacia el exterior, así ese extremo atraviesa la tapa que sella la cámara de presión. Luego, se incrementa en forma gradual la presión dentro de la cámara, desde el tanque de nitrógeno. Cuando una gota de agua aparece en el extremo por el cual se cortó la hoja, se alcanzó la presión en equilibrio, la cual queda registrada en el manómetro. Asumiendo que la presión osmótica es muy baja, la presión en equilibrio representa el potencial hídrico que tenía la planta al momento en que fue cortada la muestra. El potencial hídrico foliar es expresado por convención con valores negativos (multiplicar el valor de la presión en equilibrio por -1) y en MPa (megapascales). El potencial hídrico foliar

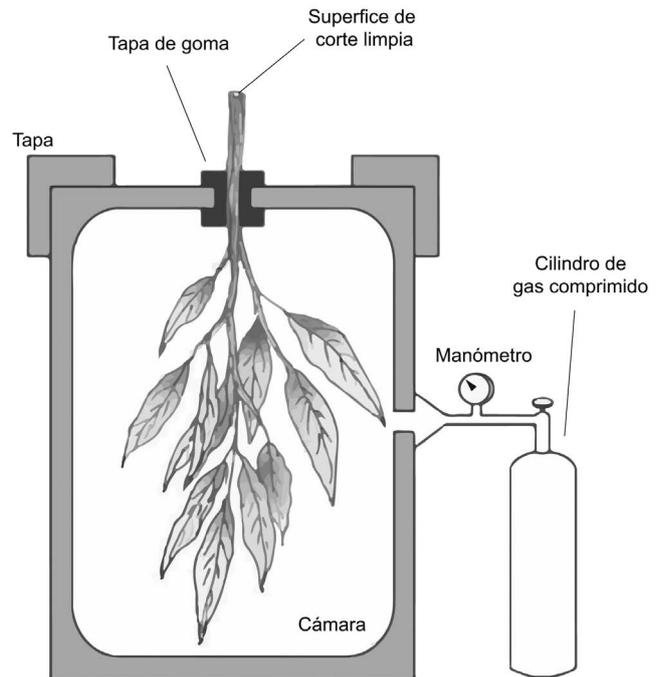


Fig. 4. Medición de potencial de agua con una cámara de presión. Se debe colocar una rama recién cortada (u hoja u hoja compuesta) dentro de la cámara de presión. El extremo final debe quedar afuera del sello (tapón de goma). Una vez que la cámara ha sido herméticamente cerrada debe aplicarse presión de manera gradual desde el cilindro de gas. Cuando la presión de la cámara sea igual a la presión del xilema, aparecerá una gota de agua en la superficie del corte de la rama. Asumiendo que el potencial osmótico del xilema es muy bajo, el balance de presión representa el potencial de agua en equilibrio para el material vegetal colocado en la cámara.

mínimo que puede alcanzar una especie usualmente varía entre 0 y -5 MPa, pero puede alcanzar valores más negativos en ecosistemas áridos o semiáridos. Se debe tener extremo cuidado cuando la cámara de presión es sometida a altas presiones.

Referencias sobre teoría, significado y bases de datos: Hinckley *et al.* (1978); Ackerly (2004); Bucci *et al.* (2004); Bhaskar and Ackerly (2006); Lenz *et al.* (2006); Jacobsen *et al.* (2008); Bartlett *et al.* (2012).

Más bibliografía sobre métodos: Scholander (1966); Turner (1988).

3.16 Palatabilidad de hojas en función de la preferencia por herbívoros modelo

A pesar de que existe una gran diversidad y complejidad

de plantas, herbívoros, e interacciones entre éstos, se han identificado algunos caracteres indicadores de la calidad de las hojas que permiten predecir la preferencia por los herbívoros generalistas. La palatabilidad de la hoja (de acuerdo a la preferencia por los herbívoros) puede ser vista como un integrador de varias de esas características subyacentes a la calidad. Además, la palatabilidad de una especie tiende a estar correlacionada entre especies con la descomponibilidad de su material senescente, dado que ambas propiedades se encuentran restringidas por factores comunes (por ejemplo, los contenidos en nutrientes bajos, alta concentración de lignina o de metabolitos secundarios).

Un método para cuantificarla palatabilidad de las hojas, de acuerdo al modelo de preferencia por herbívoros, es la realización de ensayos de cafetería en la que se permite que herbívoros generalistas seleccionen y se alimenten de muestras de hojas frescas de diferentes especies distribuidas en posiciones aleatorias en un área de alimentación. Estos experimentos pueden proporcionar información útil acerca de la preferencia del herbívoro ante una amplia gama de especies de plantas al mismo tiempo.

¿Qué y cómo colectarlo?

Las hojas deben seleccionarse y recolectarse de la misma forma indicada para otros caracteres foliares (ver

3.1.), preferentemente de al menos 10 individuos por especie. Tenga en cuenta que todas las muestras deben ser recogidas dentro de los dos días anteriores al ensayo, y ser almacenadas bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad. Si las diferentes especies crecen en diferentes estaciones del año, entonces deberán realizarse por lo menos dos ensayos de cafetería, asegurando que existan en ambos ensayos especies comunes de calidades contrastantes, para poder hacer una calibración entre los mismos.

Almacenado y procesamiento

Luego de recolectadas, las hojas se mantienen en bolsas cerradas, a 4-5 ° C hasta su procesamiento. Una vez que todo el material ha sido recogido, se cortan diez muestras de 1 cm² de superficie cada una (una muestra de hoja fresca por individuo). En el área de alimentación (que puede construirse, por ejemplo con poliestireno), las muestras se colocan aleatoriamente, sujetándolas con alfileres, en cada una de las cuadrículas numeradas, delimitadas por una grilla (Fig. 5) previamente dibujada sobre el área de alimentación (“cafetería”). En el caso de ensayos con caracoles, la superficie de la cafetería debe cubrirse con plástico transparente para que estos circulen mejor. Deben evitarse las porciones de la hoja con nervaduras grandes, a

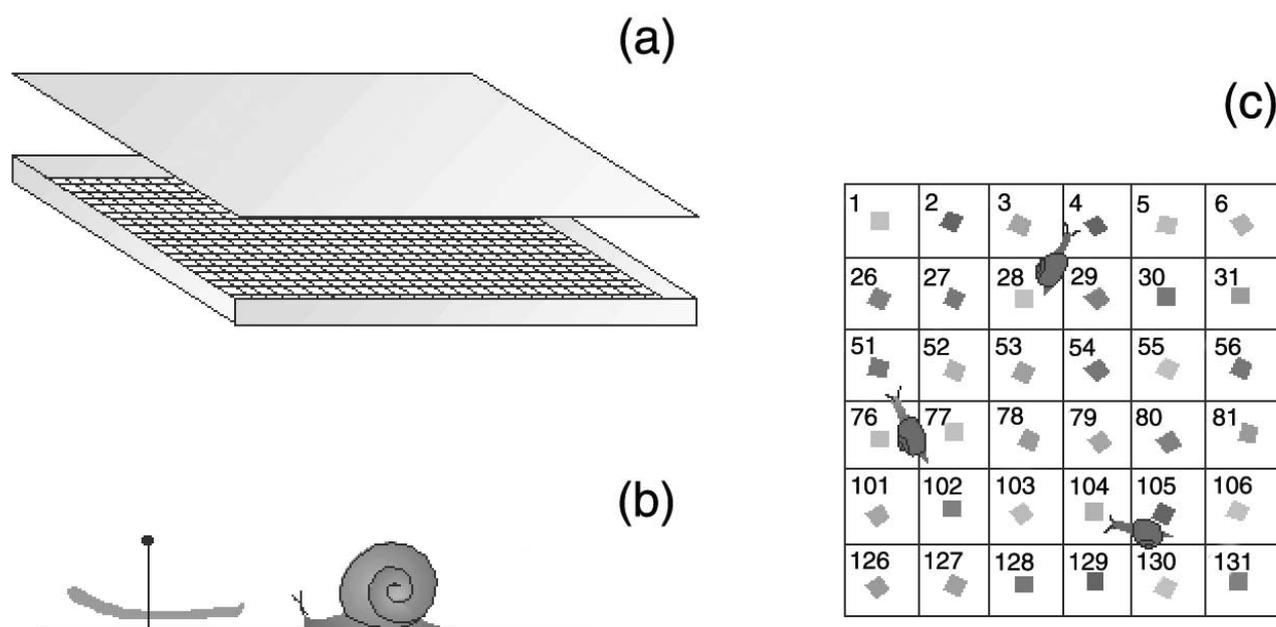


Fig. 5. Representación gráfica de un experimento de cafetería (siguiendo el protocolo propuesto por Grime *et al.* 1996, Cornelissen *et al.* 1999). Si los herbívoros modelo son caracoles, (a) el campo de trabajo (o arena) debe estar construido en poliestireno y (b) la grilla numerada debe estar cubierta con plástico de manera que los caracoles se puedan desplazar más fácilmente sobre ese sustrato. (c) Cada muestra de hoja debe estar pinchada mediante un alfiler a la grilla, evitando el contacto de la muestra de hoja con el plástico para que la muestra no se descomponga.

menos que las hojas sean demasiado pequeñas como para poder hacerlo. Para hojas estrechas, se puede lograr un área equivalente a 1 cm² cortando fragmentos de 10mm de largo y agrupándolos en forma de estrella. Cuando las hojas o folíolos son muy pequeños, también puede ocurrir que se necesite agrupar varios fragmentos, procurando una mínima superposición entre ellos, hasta aproximarse a 1 cm². En el caso de especies suculentas o áfilas, se utiliza como análogo a la hoja un fragmento de 1 cm² de la epidermis y el mesófilo adyacente (tejido fotosintético relativamente joven). Durante la preparación de todas las muestras, asegúrese de mantener las hojas cortadas en un ambiente saturado de agua (por ejemplo, bolsas de plástico que contienen en su interior una toalla de papel humedecida) para preservar la turgencia de las hojas. Se pueden incluir en el experimento muestras adicionales de un material conocido, como lechuga o acelga para consumo humano, muy palatables para algunos de los herbívoros utilizados en estas cafeterías (caracoles, babosas, langostas), a los fines de probar el comportamiento animal. Si los animales no consumen estos materiales conocidos o los animales o las condiciones de alimentación no son adecuadas.

Medición

Una vez que todas las muestras han sido ubicadas en la cafetería, se colocan los herbívoros (aproximadamente 10 por cada 500 muestras de hojas) en una posición aleatoria y la cafetería se tapa por encima (Fig. 5). La cafetería debe estar cubierta con la tapa adecuada dependiendo del tipo de herbívoro, para evitar escapes pero también para lograr un ambiente adecuado. En el caso de utilizar caracoles (por ejemplo *Helix* spp.) o babosas, debe tenerse en cuenta que los mismos requieren un ambiente fresco, oscuro y húmedo que estimule el consumo. Esto se logra pulverizando la cafetería regularmente con agua, y tapándola con un plástico oscuro u otro elemento opaco. Las langostas o saltamontes, por su parte, necesitan un ambiente seco y luminoso (en este caso, la tapa será una malla metálica o plástica), mientras que los grillos requieren un ambiente seco y oscuro. Después que se han colocado los herbívoros, el consumo se mide por observación directa después de 4, 8, y 12 horas, y posteriormente cada 12 h durante 3 días. El porcentaje del área de la hoja consumido puede ser estimado visualmente (con 2-10% de precisión por muestra) en base a la forma y superficie inicial conocidas. El área real de la hoja también puede ser medida con precisión (véase 3.1.) antes y después del ensayo siempre que las muestras no se hayan deteriorado durante el procedimiento. Para asegurarse de que los herbívoros modelo no tienen experiencia previa con las plantas incluidas en los ensayos ("memoria de consumo"), los herbívoros deben ser criados (o recogidos cuando jóvenes y mantenidos en cautiverio) sin exposición a cualquiera de las plantas incluidas en los experimentos de la cafetería. Esto y un período de ayuno de 48 horas previo al

ensayo (que promoverá el consumo durante el experimento) son importantes a fin de evitar resultados sesgados.

Casos especiales o extras

- (1) *Pruebas de alimentación independientes.* Se recomienda evaluarla palatabilidad de las hojas en al menos dos pruebas de cafetería independientes, utilizando diferentes herbívoros modelo, a los fines de cubrir una gama más amplia de preferencias por herbívoros generalistas. Los caracoles son recomendados por sus hábitos de alimentación generalista, pero consumen pocas monocotiledóneas graminoides. Los saltamontes y grillos, por su parte, son mejores en discriminar entre las cualidades de la hoja dentro del grupo de las gramíneas. En lugar de seleccionar un único tiempo para la toma de datos de consumo, son recomendables varias mediciones de consumo en tiempos diferentes, para así poder analizar y comparar una primera elección y las opciones sucesivas. Los valores de consumo de área foliar pueden transformarse en valores de biomasa de hojas si se incluye en los cálculos al área foliar específica (ver 3.1.).
- (2) *Palatabilidad vs. accesibilidad.* Los experimentos pueden ser diseñados para evaluar la palatabilidad vs. la accesibilidad siguiendo el mismo fundamento teórico en el que se basa prueba de palatabilidad. Por ejemplo, pueden ofrecerse ramas enteras, con y sin espinas, a diferentes animales (en este caso los herbívoros modelo deben ser más grandes que los caracoles o saltamontes) y registrar cuánta biomasa se consume por unidad de tiempo.

Referencias sobre teoría, significancia y bases de datos: Grime *et al.* (1970); Southwood *et al.* (1986); Coley (1987); Grime *et al.* (1996); Hartley and Jones (1997); Cornelissen *et al.* (1999); Singer (2000).

Más sobre métodos: Pérez Harguindeguy *et al.* (2003).

3.17 Descomponibilidad de broza

Las distintas especies de plantas ejercen un fuerte control sobre las tasas de descomposición a través de los efectos post-mortem de los atributos de sus módulos vivos (ya sean hojas, ramas, troncos o raíces) sobre la calidad de la broza (material senescente) que es producida. Así, los cambios en la composición de especies de plantas, producto de los factores de cambio global, uso de la tierra o resultantes de la sucesión, tienen el potencial de afectar las tasas de descomposición a nivel ecosistémico y a su vez producir retroalimentaciones en el clima mediante la liberación de CO₂. Una forma de estimar los efectos de las especies en las tasas de descomposición es la evaluación de la pérdida de masa de la broza de diferentes especies incubadas bajo las mismas condiciones, de manera simultánea en los llamados jardines comunes o camas de descomposición. La descomponibilidad especie-específica

derivada de esas incubaciones integra diferentes caracteres estructurales y químicos de la hoja (o módulo) debido a que la descomponibilidad es una expresión de la calidad del material vegetal como sustrato para los microorganismos. Así, la descomponibilidad está usualmente relacionada con el contenido de materia seca foliar, con la dureza de la hoja, así como con los contenidos de N y lignina; en algunos estudios también está relacionada con el AFE, el pH foliar, el contenido de taninos, P y cationes.

¿Qué recolectar y cómo hacerlo?

En este protocolo nos enfocaremos en broza foliar (hojarasca) pero el mismo puede ser aplicado a otras partes de la planta (ver *Casos especiales o extras* de esta sección). La hojarasca, o material vegetal senescente, debe ser recolectado fresco, en el campo, de plantas maduras. En las especies que desprenden sus hojas senescentes puede ser colectado directamente del suelo, si pasaron pocos días de su caída o colocando una tela o red bajo el árbol o rama y agitando el mismo suavemente hasta que las hojas se desprendan, o en el caso de algunas hojas simplemente tocando la hoja que está por caer. Es importante asegurarse de que no quede suelo mezclado entre las hojas recogidas. En las especies que retienen sus hojas y o que mueren completamente sobre el suelo se cortan las hojas que se considera están muertas recientemente y que no se han empezado a descomponer aún. En particular en algunas especies deciduas, esas hojas recientemente muertas suelen poseer colores otoñales brillantes. Los pecíolos y raquis de las hojas compuestas que caen como un componente integral de la broza foliar deben ser también recolectados y procesados como tales (pero ver la discusión al respecto en la sección 3.1.). En especies áfilas, donde la rama entera funciona como unidad fotosintética análoga a la hoja y también envejece como una unidad, esas unidades deben ser recolectadas como equivalentes a broza foliar. En las hojas grandes que mueren de manera muy gradual empezando por el extremo más externo y hacia el interior de la corona (como en muchas monocotiledóneas), se deben recolectar las hojas en las cuales la mitad de la lámina esté en la fase de senescencia correcta, es decir completamente muerte sin evidencias de descomposición. En las especies en las que sus hojas mueren secuencialmente en cohortes, recomendamos recolectar la broza en sucesivas veces de la misma planta, para obtener una muestra más representativa de la misma.

Almacenamiento y procesamiento

La broza recolectada en el campo debe ser almacenada en bolsas de papel abiertas para su secado al aire hasta que alcancen un equilibrio de humedad. Para preservar mejor sus características, la broza nunca debe ser secada a altas temperaturas (i.e. >40°C). Una vez que fue secada al aire, la broza puede ser almacenada en las mismas bolsas de papel,

por varios meses, siempre que las condiciones ambientales sean relativamente secas y manteniéndolas alejadas del sol. Para cada especie debe tomarse una submuestra del material secado al aire que será pesada, secada en estufa por 48 h (a 60°C) y pesada nuevamente para calcular el contenido de agua de las muestras secadas al aire y luego restarlo a los pesos de las muestras secadas al aire cuando se armen las bolsitas de broza. Si bien no existen reglas fijas en cuanto al tamaño de las bolsitas de broza, el tipo o la apertura de la malla utilizada, las mismas deben ser realizadas en un material no degradable, inerte y flexible. Típicamente, las medidas son de 10 × 10 cm o de 20 × 20 cm, en malla de fibra de vidrio o poliéster. El tamaño de las bolsitas dependerá de los materiales en estudio, pero es importante estandarizar la manera de empaquetar la hojarasca dentro de las bolsas, sobre todo si las hojas de las distintas especies poseen morfologías diferentes. En general, se usan bolsitas de malla más fina cuando alguna o algunas de las especies que se van a comparar poseen hojas muy pequeñas o delgadas. Hay que tener en cuenta que el uso de mallas más gruesas permite el acceso a un grupo más amplio de descomponedores, y tendrá menos efecto en el microclima de la bolsita. En cualquier caso, puede ser útil la comparación de los patrones de descomposición de los mismos materiales en bolsitas de diferente malla para calibrar entre ellas. Todas las bolsitas de hojarasca de un jardín común deben tener la misma cantidad inicial de material (típicamente 1 o 5g, dependiendo del ambiente y las especies estudiadas). Si las hojas son muy grandes, en comparación con las de otras especies que se compararán, puede ser necesario cortarlas en porciones similares a las de las otras especies del estudio (incluyendo porciones representativas de venas y pecíolos), para que no existan variaciones demasiado significativas en el tamaño de las bolsitas dentro de un mismo experimento. En el caso de las hojas de las monocotiledóneas, que suelen ser largas y flexibles, se pueden doblar o también cortar en segmentos. Si las especies estudiadas son muy diferentes y no se puede homogeneizar la cantidad inicial de material, es recomendable incubar especies de referencia con dos o tres cantidades iniciales de material para calibrar y poder hacer comparaciones posteriores entre especies. Es importante que las hojas no se rompan durante la manipulación y el llenado de las bolsitas. Para evitar roturas se pueden llenar las bolsas usando un embudo (de plástico o simplemente de papel) inserto en la bolsita. Una vez llenas, las bolsitas pueden ser selladas con pegamento o con un sellador de calor, pueden ser cosidas con hilo de nylon, o pueden ser engrapadas con grampas inoxidables. Dentro de las bolsitas, o firmemente adherido por fuera, debe colocarse una etiqueta resistente (usualmente plástica) con el código que indica la muestra.

Mediciones

Una vez preparadas, las bolsitas de broza son incubadas en una cama de descomposición especialmente preparada al

aire libre. Las camas de descomposición pueden ser desde un cuadrado más o menos homogéneo en el campo, limpio de vegetación y broza con las bolsitas colocadas encima, hasta una construcción más compleja de madera o cuadrados plásticos (con drenaje natural) llena con suelo cuidadosamente mezclado con broza estándar o una combinación de varias especies y cubierta con la misma mezcla de broza (Fig. 6). Dependiendo del tipo de estudio, la composición de la mezcla de suelo y broza puede involucrar una o varias comunidades y sitios; mientras que una mezcla más estandarizada que incluya no solo comunidades locales puede ser necesaria para algunos propósitos (ver más abajo dentro del mismo protocolo). En cualquier caso, la composición del material con el que se asientan y/o se cubren las bolsitas deberá ser homogéneo en toda la cama de descomposición para no causar diferencias microambientales importantes. Para tener

en consideración posibles diferencias microambientales, en particular en camas de descomposición muy grandes, se recomienda dividir la misma en bloques estadísticos iguales, en cada uno de los cuales se colocará una réplica de la especie en una posición al azar dentro del bloque. Las bolsitas de broza suelen ser incubadas uno o dos cm bajo la hojarasca mezclada que cubre la cama de descomposición para reducir la heterogeneidad en la dinámica de la humedad entre las muestras. Se pueden agregar algunas muestras adicionales que serán colocadas en la cama de descomposición y retiradas ni bien termine la instalación de la misma, para pesarlas y controlar por lo que pudieran ser pérdidas de material o ingreso de suelo en las bolsitas durante la manipulación. Al instalar la cama de descomposición, está puede ser rociada con agua desmineralizada o con agua de lluvia para llevar las muestras a capacidad de campo más rápidamente. Para

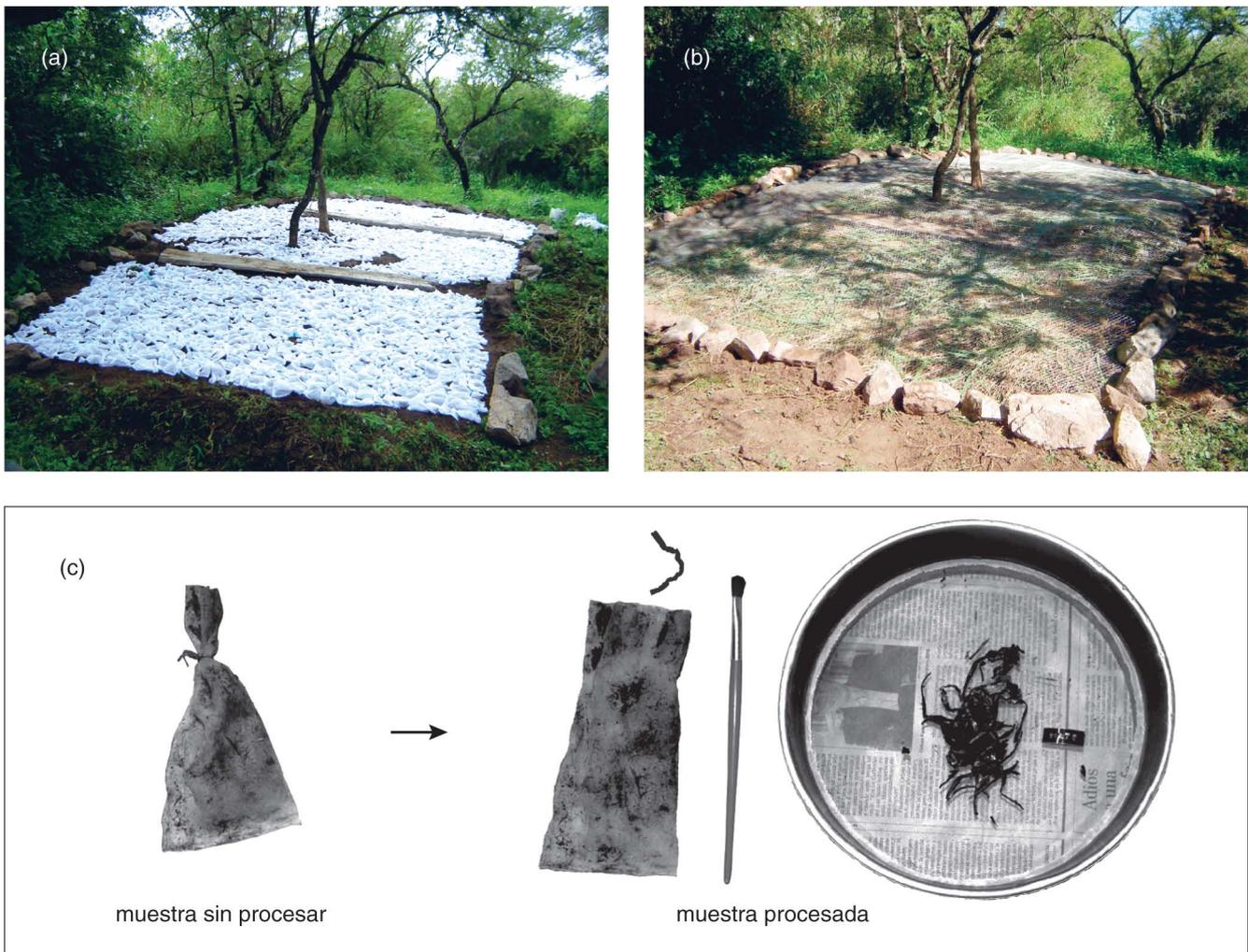


Fig. 6. Cama de descomposición y limpieza de las bolsitas de broza. Se muestran imágenes de; (a) cama de descomposición cubierta de bolsitas de broza; (b) bolsitas de broza colocadas en la cama de descomposición y cubiertas con mezclas naturales de broza y protegidas con una malla metálica; y (c) limpieza de las bolsitas de broza con cepillo.

evitar roturas en la cama de descomposición y pérdida de bolsitas, se puede colocar una malla de nylon o metal de 3 a 5 cm de apertura sobre la cama y así protegerla de la acción de mamíferos y aves. Para tener una medida de la cantidad de material externo que entra en las bolsitas durante la incubación, se pueden colocar algunas extra, y dejarlas durante todo el período de incubación, conteniendo un fragmento de plástico que represente las hojas. Las fechas y cronograma de recolección de las muestras variarán, en primer lugar de acuerdo a las condiciones climáticas y microclimáticas que determinarán las tasas de descomposición promedio en el área de estudio, y en segundo lugar en virtud de la calidad de la broza incubada. En ambientes tropicales húmedos la mayor parte de la broza llegará a perder el 90% de su masa en 2 meses o menos, mientras que en ambientes fríos o áridos es posible que en 2 años recién se alcance una pérdida del 50% de la masa inicial aún si se considerara la misma calidad de broza. Generalmente 2 fechas de recolección de bolsitas son suficientes para evaluar la consistencia de las clasificaciones (rankings) de descomponibilidad de las especies en el tiempo, mientras que 5 o más fechas de recolección permitirán además evaluar al dinámica de la descomposición. Luego de la recolección, las muestras deben ser lavadas y procesadas directamente, de lo contrario almacenadas en congelador hasta su procesamiento. Las muestras recolectadas luego de la incubación deben ser limpiadas lo más exhaustivamente posible de suelo, fauna y otros materiales externos que puedan haber quedado adheridos a la broza en descomposición, por ejemplo con pinzas o pequeños pinceles (Fig. 6). Ya limpias, las muestras de broza descompuesta deben ser secadas en horno por 48 h a 60°C y luego pesadas. La tasa de descomposición puede definirse como el porcentaje de pérdida de biomasa luego del período de incubación, o como k (constante de descomposición) derivada de una curva exponencial teórica de pérdida de biomasa sobre el tiempo, involucrando más de una recolección:

$$k = -\ln(M_t/M_0)/t,$$

Donde k = constante de tasa de descomposición (año⁻¹), M_0 = masa de broza en el tiempo 0, M_t = masa de broza en el tiempo t , y t = tiempo de incubación (años).

Calibración entre estudios

Una desventaja del método de camas de descomposición es que el clima, microambiente y períodos de descomposición varían entre estudios. Una opción cuando se trabaja con broza de distintos lugares, es la construcción de una única cama de descomposición que centralice todas las muestras y las incube simultáneamente. Aún mejor podría ser, si deben realizarse sucesivas camas de descomposición, establecer ciertas condiciones ambientales estándar o comunes a todas

ellas, por ejemplo realizándolas en un ambiente relativamente controlado en invernadero. Sin embargo, esto no siempre es posible. Si deben hacerse incubaciones en distintos lugares con distintos grupos de especies, una alternativa es incluir en todas las camas de incubación algunos materiales comunes o estándar que pueden servir para comparar los patrones encontrados en distintas camas, o hacer luego una cama que incluya algunas muestras de algunas de las especies incluidas en las anteriores para calibrar las camas entre sí.

Casos especiales o extras

- (1) *Microcosmos*. Aunque la mayoría de las camas de descomposición se hacen bajo condiciones de campo, las bolsitas de broza también pueden ser incubadas en microcosmos para evaluar particularmente el efecto del suelo, la fauna del suelo o la broza, o los lixiviados asociados a la descomposición, etc. Al igual que en los experimentos de jardín común, las muestras de broza incubadas en los microcosmos serán recolectadas a intervalos de tiempo seleccionados en base a los objetivos del estudio, las características de la broza y las condiciones de los microcosmos. El material incubado (broza descompuesta) puede ser luego analizado para determinar no solo su pérdida de masa sino también los cambios químicos producidos en esa broza y la colonización por distintos descomponedores.
- (2) *Contaminación*. Cuando la contaminación de las muestras de broza con arena o arcilla es alta, aún después de haber extraído los materiales exógenos más evidentes, puede ser necesario secar la muestra, y luego volver a limpiar los restos de arena y arcilla. Si aun así la muestra estuviera contaminada, será necesario calcinar las muestras por 4 h a 450°C en una mufia y luego expresar la masa perdida sobre el material libre de cenizas (%) de la masa inicial y final (este procedimiento no es apropiado para suelos con mucha materia orgánica).
- (3) *Fotodegradación*. Debe tenerse en cuenta que en algunos ambientes áridos y ventosos, con gran irradiación, la pérdida de masa por fotodegradación o abrasión (adicionalmente a la descomposición microbiana) puede ser muy importante y podría afectar las clasificaciones de las especies en base a su descomponibilidad en condiciones de incubación no expuestas (bajo una capa de broza). A su vez, puede ser interesante evaluar la fotodegradabilidad de diferentes especies y compararla con la descomponibilidad causada por microorganismos.
- (4) *La descomponibilidad de otros órganos* (raíces y ramas), y la magnitud en la que está coordinada su descomponibilidad con la de las hojas pueden ser

preguntas de relevancia ecológica. Existen nuevos métodos para incluir residuos leñosos de distintos tamaño en experimentos de descomposición en jardín común.

Referencias sobre teoría, significado y bases de datos: Cornelissen (1996); Cadisch and Giller (1997); Cornelissen *et al.* (1999, 2007); Garnier *et al.* (2004); Austin and Vivanco (2006); Parton *et al.* (2007); Adair *et al.* (2008); Cornwell *et al.* (2008); Fortunel *et al.* (2009); Freschet *et al.* (2012).

Más bibliografía sobre métodos: Taylor and Parkinson (1988); Cornelissen (1996); Robertson *et al.* (1999); Graça *et al.* (2005); Berg and Laskowski (2006); Freschet *et al.* (2012).

4 Caracteres de tallo

4.1 Densidad específica del tallo

La densidad específica del tallo (DET, o SSD por sus siglas en inglés; mg mm^{-3} o kg dm^{-3}) es el peso seco (a 70 °C por 72 h, pero ver *Casos especiales o extras* al final de la presente sección) de una sección del tallo principal de una planta, dividido por el volumen verde (fresco) de esa misma sección. La densidad específica de tallo puede usarse como sinónimo de “densidad del tallo” a secas. La densidad específica de tallo puede medirse en especies herbáceas e incluye la corteza (es decir, el floema secundario y el súber o corcho cuando están presentes), que en algunos casos representa una significativa proporción de la estructura del tallo (ver *Casos especiales o extras* al final de la presente sección). La densidad de leño, en cambio, solo puede ser medida en especies leñosas y excluye la corteza (ver *Casos especiales o extras* al final de la presente sección).

La DET es como un carácter funcional central dada su importancia en cuanto la estabilidad, defensa, arquitectura, características hidráulicas, absorción de C y potencial de crecimiento de las plantas. Así, la densidad del tallo es fundamental en el compromiso funcional entre supervivencia y crecimiento de las plantas. Una baja densidad de tallo (la presencia de vasos de conducción grandes) permite un rápido crecimiento a un bajo costo de construcción volumétrico y con una gran capacidad hidráulica. Por su parte, una alta densidad de tallo (la presencia de vasos de conducción pequeños) se asocia a una mayor a una mayor supervivencia debido a que permite una mayor seguridad hidráulica y biomecánica, resistencia frente a patógenos, herbívoros o daño físico. Al mismo tiempo, y en combinación con otros caracteres asociados al tamaño de la planta, la densidad de tallo tiene un rol esencial en la acumulación de C en la biomasa vegetal.

¿Qué recolectar y cómo hacerlo?

Las plantas seleccionadas para realizar las mediciones de densidad de tallo deben ser individuos adultos sanos, siguiendo las sugerencias detalladas previamente (Sección 1). La decisión entre medir densidad de tallo o de leño dependerá de los objetivos de cada estudio particular (ver *Casos especiales o extras* al final de la presente sección). Para la medición de la densidad de tallo, se debe remover sólo la corteza que se desprenda fácilmente (corteza suelta y funcionalmente separada del tallo) (ver Sección 4.3). La densidad de leño puede aumentar, disminuir o mantenerse constante desde la médula hasta la corteza (dependiendo de la especie), por lo que una muestra representativa debe incluir todos los tejidos del tallo. La densidad de tallo es mayor en el punto de inserción de las ramificaciones (debido a que los vasos se estrechan en este punto), y menor en las ramas y en la corteza externa (que incluye más espacios con aire y súber). Este gradiente de densidad de tallo tiene importantes implicancias en el procedimiento de muestreo. Para obtener una muestra sobre la que se medirá DET, recomendamos extraer una sección transversal completa del tallo principal, o en el caso de árboles muy grandes, una sección transversal triangular con su extremo más agudo hacia el centro del tallo (similar a una porción de pizza), que represente $\sim 1/8$ del área total. Para especies herbáceas o especies leñosas con tallos principales muy delgados (< 6 cm diámetro), recomendamos proceder cortando con un cuchillo o sierra una sección de aproximadamente 10 cm de alto cerca de la base del tallo (entre los 10 y los 40 cm de altura desde el suelo). De ser posible, se debe seleccionar una sección del tallo principal que sea regular y sin ramificaciones, o quitar las ramificaciones de esta porción del tallo antes de extraer la muestra. Para plantas leñosas o suculentas con > 6 cm de diámetro cortar una sección similar a una porción de pizza de un espesor de 2-10 cm a una altura del tronco correspondiente a 1.3 m desde el nivel del suelo (altura del pecho). Las muestras obtenidas en especies de madera dura puede ser almacenadas en una bolsa de plástico sellada (preferentemente en frío) hasta el momento de la medición. Las muestras obtenidas de especies herbáceas o de madera blanda pueden ser más vulnerables a la desecación y consecuente reducción de tamaño, por lo que deben ser envueltas en un paño de papel húmedo dentro de bolsas de plástico (y también almacenadas en frío) hasta el momento de la medición.

Mediciones

El *volumen del tallo* puede ser determinado, al menos, a través de dos procedimientos distintos:

- (1) *Método de desplazamiento de agua.* Este procedimiento permite medir el volumen de muestras irregulares cuyo volumen no puede ser estimado de forma precisa a través del método dimensional descrito más abajo. El procedimiento consiste en llenar casi completamente con agua destilada un tubo graduado o vaso de precipitación lo suficientemente grande como para sumergir la muestra completamente (tener precaución de que el nivel del agua sea tal que al sumergir la muestra el agua no se derrame fuera del tubo). Ubicar el tubo con agua sobre la balanza y tarar. La muestra de tallo es sumergida completamente en el agua con la ayuda de una aguja o pinza, teniendo especial cuidado de no tocar los lados o el fondo del tubo que contiene la muestra, ya que de esto puede causar variaciones de peso en el registro de la balanza. Al sumergir la muestra, el nivel de agua aumenta incrementando el peso que está siendo registrado por la balanza (el peso del agua desplazada), que equivale al volumen de la muestra en cm^3 (ya que el agua tiene una densidad de 1 g cm^{-3}). El peso registrado en la balanza (el volumen de la muestra) debe ser rápidamente leído por el usuario. Es preciso reemplazar el agua y volver a tarar luego de cada medida.
- (2) *Medidas de las dimensiones (método dimensional).* El volumen de una muestra cilíndrica puede ser simplemente determinada a través de la medición de la longitud (L) y diámetro (D) en uno o más puntos a lo largo de la muestra, utilizando calibres. Si el tallo es muy delgado, la determinación del diámetro puede hacerse sobre un corte transversal bajo microscopio, utilizando un micrómetro ocular calibrado.

El volumen (V) del cilindro puede entonces ser calculado como:

$$V = (0.5D)^2 \times \pi \times L$$

En el caso de especies con tallos huecos (p.e., juveniles de *Cecropia* o algunas especies de bambú), el procedimiento consiste en estimar el diámetro del hueco y sustraer su área transversal del área transversal del tallo antes de multiplicar por L. Este método puede ser aplicado a muestras que tienen diferentes formas geométricas definidas. Luego de las mediciones de volumen (por cualquiera de los métodos descritos previamente) la muestra es secada en estufa. Además de contener agua libre, los tallos también contienen agua inmovilizada en los tejidos, que sólo puede ser removida secando las muestras a más de 100°C . Las muestras deben ser secadas en un horno con buena ventilación a $101\text{-}105^\circ\text{C}$ por $24\text{-}72 \text{ h}$ o hasta peso constante (si son muestras pequeñas). Las muestras grandes pueden requerir más tiempo de secado.

Otros métodos forestales útiles

En estudios de ecología forestal, es frecuente el uso de barrenos para la obtención de muestras de leño. Las muestras de madera son extraídas del centro del tronco principal, excluyendo la corteza. La muestra obtenida usando este procedimiento puede no ser perfectamente representativa de la densidad del tallo como un todo. Sin embargo, la diferencia de la estimación de la densidad utilizando un sector, o una sección completa del tallo es frecuentemente muy pequeña. Los barrenos de diámetros mayores (12mm) son mejores debido a que causan una menor compactación del tejido leñoso. La extracción de muestras utilizando este procedimiento se realiza frecuentemente a una altura del tronco de $1,3 \text{ m}$ desde el suelo (“altura del pecho”). Luego que la muestra es extraída, puede ser almacenada en una pajita plástica de beber con sus extremos sellados para evitar la pérdida de agua. En la industria maderera, el término ‘densidad de leño’ es usado cuando la estimación es realizada a un contenido de humedad del 20% , siendo en tal caso reportada como ‘peso secado al aire’ (PSA) (un nombre incorrecto en realidad debido a que densidad no es equivalente a peso sino a peso/volumen). DET tal y como se describe en el presente protocolo es equivalente a la denominación de ‘peso secado en horno’ (PSH). PSA puede ser transformado en PSH usando la siguiente fórmula:

$$\text{PSH} = 0,800 \text{ PSA} + 0.0134 \text{ (R}^2 = 0,99\text{)}$$

Esta fórmula sólo puede ser usada para corregir densidades pero no pesos. Se considera que los valores de PSH, medidos directamente u obtenidos de la conversión a partir de PSA, pueden ser efectivamente usados como equivalentes a DET. Estos valores ignoran la contribución de la corteza a la densidad de leño; sin embargo, debido que la corteza usualmente representa una muy baja proporción de la masa del tronco de un árbol, es probable que este error sea pequeño, excepto en los casos descritos más abajo.

Casos especiales o extras

- (1) *Secado al horno y densidad específica de leño.* Debido a que el tejido leñoso se compone principalmente de celulosa y lignina, contiene una gran proporción de agua inmovilizada y sólo pequeñas cantidades proporcionales de compuestos de bajo peso molecular. Es por ello que muchos científicos y forestales secan las muestras a 100°C – 110°C antes de determinar tanto peso como volumen de leño. Luego de ese secado la relación entre peso y volumen se expresa como densidad específica de leño.
- (2) *Tallos agujereados.* En algunas especies, existen huecos muy grandes en el tallo que son considerados como aire

o espacios con agua, y no pertenecen al tejido vegetal. Aquellos espacios pequeños como el lumen de los vasos del xilema y los espacios intercelulares sí constituyen parte del tejido vegetal.

- (3) *Densidad de leño vs. densidad de tallo.* En algunos casos puede ser de utilidad obtener estimaciones separadas para la madera y la corteza, ya que pueden presentar diferencias en la composición química y celular, las propiedades físicas y las funciones biológicas. Muchos árboles y arbustos en sistemas de sabana (y también algunas especies de sistemas áridos como las Mediterráneas) tienen, por ejemplo, una corteza muy gruesa de corcho (con una densidad muy baja). Frecuentemente el volumen de dicha corteza gruesa puede representar una importante proporción del volumen total del tallo (hasta el 50% en algunos casos). En estas especies, la mayoría del soporte estructural está dado por la madera que es generalmente más densa que la corteza, y en consecuencia, desde un punto de vista meramente estructural, la densidad de la madera en sí misma puede ser el parámetro más importante.
- (4) *Densidad del xilema.* Algunos autores hacen la distinción entre densidad de leño (densidad de leño obtenida secando en horno muestras extraídas del tronco principal incluyendo tanto duramen como albura) y densidad de xilema o densidad de albura (medido en las ramas terminales de diámetro pequeño (~1,5 cm). La densidad de albura es usualmente propuesta como un indicador de la arquitectura hidráulica de las plantas leñosas que, a su vez, puede limitar la eficiencia en términos de transpiración, intercambio de C y crecimiento.
- (5) *Plantas que no presentan un tallo aéreo prominente* (plantas en roseta, pastos y juncos). Para medir la densidad de tallo en estos casos, es conveniente usar el tallo corto y condensado que se encuentra a nivel del suelo y al cual están sujetas las hojas. En algunas plantas, las hojas están unidas a un tallo subterráneo, usualmente horizontal, que corresponde a una modificación denominada rizoma (ver la sección 2.3). Sobre este rizoma se puede estimar la densidad, aunque no es un equivalente funcional del tallo aéreo en lo que respecta al soporte mecánico de las hojas. Muchas plantas en rosetas y graminoides con hojas basales, producen inflorescencias aéreas con tallos a los que es factible determinarles la densidad; sin embargo, al igual que en los casos precedentes, este tallo no es funcionalmente equivalente al soporte de hojas fotosintéticamente activas que tienen las plantas con tallo aéreo desarrollado (ver sección 2.3). Si la planta no tiene un tallo reconocible con función de soporte foliar, una categorización cualitativa de 'sin tallo' sea probablemente más conveniente para posteriores análisis que adjudicar un valor de cero. Si la planta se

ramifica a nivel del suelo (por ejemplo en el caso de muchos arbustos), seleccionar la rama principal, o una al azar si todas son relativamente similares.

- (6) *Maderas muy densas.* Cuando se extraen muestras de árboles con una densidad muy alta, puede servir de ayuda usar una cuerda alrededor del árbol y sujetarla en el mango del barreno. Al girar el barreno durante la extracción de la muestra, la cuerda se ajusta aumentando la tensión y ayudando al barreno a penetrar en la madera del árbol.
- (7) *Midiendo ramas distintas al tallo principal.* En el caso de que las muestras no puedan ser extraídas del tallo principal del individuo, pueden usarse ramas de 1-2 cm de diámetro para estimar la densidad. La densidad del tallo principal parece ser, en promedio, igual a 1,411 x densidad de leño de la rama medida, aunque esta relación puede variar entre especies y su uso puede introducir algún error.
- (8) *Componentes del volumen del tallo* (materiales de la pared celular, agua, gas). Las fracciones volumétricas del tallo asociadas a la pared celular, agua y gas ('aire') pueden calcularse como se describe a continuación. La fracción de volumen ocupada por el agua corresponde a la diferencia de peso (g) de la muestra luego del secado, dividida por el volumen original (cm³) de la muestra. La fracción de volumen ocupada por el material asociado a la pared celular equivale al cociente entre el peso seco: volumen fresco, dividido por la densidad del material asociado a la pared celular (1,53 g cm⁻³ para la pared celular de la madera seca); si una parte importante de la fracción del volumen de tallo es la corteza, usar este valor puede introducir un error debido a que la densidad de la pared celular de la corteza no es necesariamente la misma que la de la madera. La fracción del volumen original que corresponde a gas es simplemente 1 menos las dos fracciones de volumen anteriores.

Referencias sobre la teoría, significado y bases de datos:

Putz *et al.* (1983); Loehle (1988); Reyes *et al.* (1992); Niklas (1994); Gartner (1995); Santiago *et al.* (2004); Van Gelder *et al.* (2006); Poorter *et al.* (2008); Chave *et al.* (2009); Patiño *et al.* (2009); Anten and Schieving (2010).

Más bibliografía sobre métodos: Reyes *et al.* (1992); Brown (1997); Gartner *et al.* (2004); Chave *et al.* (2005); Swenson and Enquist (2008); Williamson and Wiemann (2010).

4.2 Contenido de materia seca y tiempo de secado de ramas terminales

El contenido de materia seca de las ramas terminales (CMSRT) hace referencia al peso seco (en estufa) (mg) de una rama terminal, dividida por su peso saturado de agua (g), expresado en mg g⁻¹. El tiempo de secado de una rama

terminal se expresa en días transcurridos hasta lograr un peso constante. El CMSRT es considerado un componente crítico de la inflamabilidad potencial de las plantas, en particular, se asocia a la conductividad del fuego luego de la ignición (ver Sección 2.12). Se espera que las ramas terminales con alto contenido de materia seca se sequen relativamente rápido durante la estación seca en sistemas propensos a incendios. El CMSRT muestra una correlación positiva con la densidad específica o el contenido de materia seca del tallo principal de las especies leñosas (ver Sección 4.1), y se correlaciona negativamente con TCR (RGR por sus siglas en inglés) potencial, aunque, a nuestro entender, esto no ha sido explícitamente testeado todavía.

¿Qué recolectar y cómo hacerlo?

Recomendamos recolectar de una a tres ramas terminales (aquellas que presentan el mayor orden de ramificación y la menos clase diamétrica) expuestas al sol, de un mínimo de 5 plantas. Las ramas terminales (o sus secciones) deben tener idealmente unos 20-30 cm de largo. Si la planta no tiene ramas, tomar una sección del tallo principal; en ese caso, el procedimiento puede ser combinado con el de DET (ver Sección 4.1). Para aquellas ramas terminales muy finamente ramificadas, puede considerarse a una rama central con pequeñas ramificaciones que se dependen de ella como una misma unidad de medición.

Almacenamiento y procesamiento

Una vez recogidas, se deben envolver las ramas terminales (incluyendo sus hojas asociadas) en un papel húmedo y colocarlas en bolsas plásticas cerradas. Luego se debe almacenar estas bolsas en una conservadora o heladera (nunca en el freezer), hasta el momento del procesamiento en el laboratorio. Si no existen posibilidades de tener una conservadora en el campo y las temperaturas son altas, entonces conviene almacenar las muestras en bolsas plásticas sin humedecer, y luego seguir el procedimiento descrito a continuación en el laboratorio.

Mediciones

Siguiendo el proceso de rehidratación (ver Sección 3.3), se remueven las hojas presentes y las ramas terminales se secan suavemente con paños de papel con el objetivo de remover cualquier rastro de agua superficial previo a la medición del peso saturado de agua. Cada muestra (consistente en 1-3 ramas terminales) se seca en una estufa o habitación de secado a 40 °C y a una humedad relativa del aire del 40% o menor. Luego se pesan las muestras cada 24 h. El tiempo de secado de las ramas terminales se define como el número de días que lleva reducir a 95% el peso de la muestra como resultado del proceso de secado (interpolando

entre pesadas si es necesario). El 100% de pérdida de peso corresponde a la pérdida final de peso, es decir cuando la muestra secada llega a peso constante.

El CMSRT es definido (al igual que CMSF) como la masa seca dividida por la masa saturada de agua. El peso seco final obtenido a 40 °C no es considerado el peso seco real de la rama debido a que a esta temperatura, el agua inmovilizada dentro de la pared celular del material (y probablemente también en sus proteínas) no ha sido totalmente removida (ver Sección 4.1). Sin embargo, la elección de esta baja temperatura en comparación con la temperatura usada en el seccionamiento 4.1 es con el fin de obtener ramas terminales en una condición de secado relativamente similar a la que se obtiene durante el secado al exterior (al sol) en un tiempo relativamente corto.

Casos especiales o extras

- (1) *Plantas herbáceas.* Para especies de plantas herbáceas el equivalente a CMSRT es el contenido de materia seca del tallo, que puede ser medido exactamente igual que CMSF pero usando el tallo principal de herbáceas o la vaina de las hojas de pastos.

Referencias sobre la teoría, significado y bases de datos: Bond and Van Wilgen (1996); Lavorel and Garnier (2002); Shipley and Vu (2002).

Más bibliografía sobre métodos: Garnier *et al.* (2001b).

4.3 Espesor de la corteza (y calidad de corteza)

El espesor de la corteza se refiere a cuán ancha es la corteza en mm. La corteza se define aquí como la parte del tallo externa a la madera o xilema y que, por lo tanto, incluye al cambium vascular. Una corteza gruesa permite aislar meristemas y yemas primordiales de las temperaturas letales que alcanza el fuego durante un incendio (aunque la efectividad de la corteza dependerá de la intensidad y la duración del fuego, el diámetro del tronco o rama, la posición de la yema primordial dentro de la corteza o cambium y la calidad y humedad de la corteza). Una corteza gruesa puede además proveer protección a los tejidos vitales frente al ataque de patógenos, herbívoros, heladas o sequías. En general, este carácter tiene especial relevancia en árboles y arbustos grandes sujetos a regímenes de fuego superficial. Hay que tener cuidado con el hecho de que la estructura y bioquímica de la corteza (p.e., suberina en el corcho, lignina, taninos, otros fenoles, gomas, resinas) son a menudo importantes componentes de defensa de la corteza.

¿Qué recolectar y cómo hacerlo?

Las muestras deben ser recolectadas en plantas adultas sanas como se indica previamente (ver Sección 1.1). Es

conveniente que el espesor de la corteza sea medido en un mínimo de 5 individuos adultos y preferentemente en las mismas muestras usadas para la determinación de DET para minimizar la cantidad de plantas dañadas (ver Sección 4.1). Las mediciones deben realizarse en el tallo principal cerca de la base, entre los 10 y 40 cm desde el suelo, ya que es principalmente la altura asociada a la ocurrencia de fuegos superficiales (pero ver *Casos especiales o extras* en la presente Sección). Si se utilizan muestras distintas a las usadas para determinar DET, cortar una nueva sección de la corteza de al menos unos centímetros de ancho y largo. Evitar agallas, espinas o cualquier otro tipo de protuberancias y remover cualquier resto de corteza que ya esté desprendida. La corteza, de acuerdo a la definición presentada aquí, incluye todo lo externo a la madera (i.e., cambium vascular, floema secundario, felodermis o córtex secundario, cambium del corcho (súber) o corcho).

¿Cómo realizar las mediciones?

Para cada muestra o árbol, realizar 5 mediciones al azar del espesor de la corteza con un calibre (o con alguna herramienta específica de las usadas en las ciencias forestales). De ser posible realizar estas mediciones con 0,1 mm de precisión. Para la medición en especies de corteza agrietada ver *Casos especiales o extras* en la presente Sección. Luego de realizadas las mediciones, estimar el promedio de las mediciones por muestra. De esta manera, el espesor de la corteza (mm) se calcula como la media de los promedios para todas las muestras.

Casos especiales o extras

- (1) *Calidad de la corteza.* Además del espesor de la corteza, muchos otros componentes estructurales o químicos pueden ser de interés particular (ver más arriba en el presente Protocolo). Una medida sencilla pero importante es la presencia (1) o ausencia (0) de gomas o resinas (líquidas o viscosas) visibles en la corteza.
- (2) *Estructura de la corteza superficial (textura).* Permite determinar la captura y/o almacenamiento de agua, nutrientes y materia orgánica. Se sugieren aquí 5 categorías amplias (subjetivas), incluyendo (1) textura lisa, (2) levemente texturada (amplitudes de microrelieve dentro de los 0,5 mm), (3) textura intermedia (amplitudes de 0,5 - 2 mm), (4) textura gruesa (amplitudes de 2 - 5 mm) y (5) textura muy gruesa (amplitudes > 5 mm). La textura de la corteza puede ser medida separadamente sobre el tronco y sobre pequeñas ramas o ramas terminales, ya que este carácter puede presentar gran variación a lo largo de las diferentes ramas y estar asociada a comunidades epífitas diferentes.

- (3) *Cortezas agrietadas.* En cada muestra, se deben tomar 5 medidas al azar del espesor máximo (fuera de la grieta) y del espesor mínimo (dentro de la grieta). Luego calcular el espesor de la corteza como el promedio entre ellas.
- (4) *Alturas alternativas para las mediciones.* En trabajos forestales, el espesor de la corteza es típicamente medido a la altura del pecho (como el DAP). Las mediciones realizadas en la base del árbol, como se sugiere en el presente protocolo, tiene algunas ventajas (asociadas a la resistencia al fuego) y algunos problemas (a menudo la base del árbol está deformada). Una alternativa plausible puede ser realizar esta medición a unos ~50-60 cm desde el nivel del suelo. De cualquier manera el espesor de corteza a 50 cm del suelo está fuertemente asociado al grosor de corteza a la altura del pecho.
- (5) *Corteza decorticada.* Aquella corteza que se desprende fácilmente del árbol (sin unión funcional al tronco) es usualmente considerada como parte de la broza, por lo que no es incluida en las mediciones de espesor de corteza (sin embargo, dependiendo de los objetivos particulares, puede incluirse en la medición).
- (6) *Inversión en corteza.* Una medida complementaria a las mediciones de espesor de corteza puede ser el diámetro del tallo, ya que puede ser útil para comparar la inversión de corteza entre especies (dividiendo el espesor de la corteza por el radio del tallo).

Referencias sobre la teoría, significando y bases de datos: Jackson *et al.* (1999); Brando *et al.* (2012).

4.4 Conductividad del xilema

El transporte del agua desde el suelo hasta las hojas es un proceso indispensable para el buen funcionamiento de las plantas terrestres. Al remplazar el agua perdida por la transpiración, el transporte del agua previene que se alcancen potenciales hídricos negativos que son perjudiciales para el desarrollo, permitiendo que la fotosíntesis no se detenga. La eficiencia del transporte del agua en una especie puede ser cuantificada a través de la conductividad hidráulica específica del tallo (K_s), la cual representa el flujo de agua por unidad de área de una sección transversal del xilema por unidad de presión ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$). También puede ser cuantificado, a través de la conductividad hidráulica específica foliar (K_L), la cual representa el flujo de agua que suministra a una superficie foliar dada a una presión en particular ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$). K_L representa la conductividad de una rama en relación a la demanda de transpiración del follaje de esa misma rama. K_L se iguala K_s si se la divide por la proporción entre el área foliar y el área de conducción (ver 2.8.). El xilema hace referencia al tejido de conducción del leño, que en leñosas equivale a la albura (*sapwood*). La

K_s es una función del número y diámetro de los vasos del xilema, del grado de interconexión entre ellos mediante las puntuaciones de las paredes celulares de los miembros de vasos. La conductividad de un elemento del xilema (vaso) aumenta a la cuarta potencia del diámetro del mismo. Este incremento puede ser modelado aplicando la ley Poiseuille que permite determinar el flujo laminar de un líquido en un tubo cilíndrico.

¿Qué recolectar y cómo hacerlo?

Es conveniente realizar las mediciones en el laboratorio, utilizando ramas recolectadas en el campo, las cuales deben ser conservadas en ambientes frescos y con el extremo donde fueron cortadas sumergidos en el agua hasta su procesamiento. Las ramas recolectadas deberán tener una longitud mayor a los vasos de conducción de mayor longitud, de manera que la medición de conductividad incluya la resistencia de un vaso de conducción y sus miembros de vasos. Se ha observado que existe un amplio rango de variación en la longitud de los vasos de conducción entre especies. Por ejemplo las gimnospermas exhiben traqueidas de longitud pequeña (usualmente menor a 1 cm de longitud), mientras que en angiospermas, la longitud de los vasos de conducción puede alcanzar más de un metro de longitud (aunque usualmente alcanzan entre 10-30 cm, ver *Casos especiales o extras* (i) más abajo). En general, se utilizan segmentos de unos 30 cm de longitud. La K_s suele disminuir a medida que nos acercamos a las hojas debido a que se produce un empaquetamiento y una reducción del número y el tamaño de los vasos de conducción. En la mayoría de los casos, las mediciones son realizadas en ramas recolectadas en la periferia del dosel y, por ello, se considera que representan al segmento con la menor conductividad de todo el sistema de transporte del agua.

Mediciones

Los métodos aquí descriptos han sido desarrollados en gran medida para estudiar los leños de plantas leñosas, por lo cual son los más simples. Sin embargo, existen métodos análogos para estudiar plantas herbáceas, hojas y raíces. Para realizar las mediciones de la conductividad del xilema, se han desarrollado algunos aparatos sofisticados, pero también se han construido sistemas simples a partir de equipamiento de laboratorio ordinario. Un método sencillo consiste en aplicar una presión conocida para que una solución de 10 mM de KCl (realizada con agua filtrada y desgasificada) pase a través de un leño con un área de sección transversal conocida y en lo posible sin ramificaciones (aunque si las tuviera pueden ser cortadas y selladas por ej. con parafina). En el extremo distal del segmento debe haber un recipiente que colecte el agua que atraviesa el leño y, después de un intervalo de tiempo conocido, se debe determinar cuál es

el volumen de esa agua recolectada. La conductividad es calculada como:

$$K_s = J \times L \times A^{-1} \times DY^{-1}$$

Donde J es la tasa de flujo de agua a través del leño (kg s^{-1}), L es la longitud del segmento (m), A es el área de la sección transversal media del xilema del leño (una primera aproximación puede ser el promedio de las áreas de los dos extremos del segmento), DY es la diferencia de presión (MPa) entre los dos segmentos extremos del segmento de leño. En el caso de que el segmento sea mantenido en posición vertical durante las mediciones, su longitud (en metros) dividida por 10 debería ser agregada a la presión aplicada (MPa), pero no si el segmento de leño está en posición horizontal. El K_s generalmente se reporta en $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$. Al tomar mediciones en segmentos de ramas terminales o subterminales se puede asumir que A es toda el área de la sección transversal del xilema, es decir, todo el xilema es conductor. No obstante, en ramas de mayor tamaño o en los troncos de árboles, A sería solo el área conductiva (o activa) del xilema la cual no es fácilmente determinada mediante mediciones de rutina.

La conductancia del xilema, por su parte, es un indicador de la capacidad del sistema vascular, independientemente de la longitud y del área de sección transversal que tenga la muestra, para transportar agua bajo una diferencia de presión. La conductancia puede ser calculada desde la ecuación de más arriba simplemente omitiendo los parámetros A y L.

Casos especiales o extras

- (1) *Longitud de los vasos de conducción.* Esta información es necesaria en las mediciones de conductividad para asegurarse de que la longitud del segmento de leño utilizado sea de mayor longitud que la de los vasos de conducción. Para determinar la longitud máxima de un vaso de conducción, hay que cortar distintos segmentos del leño que difieran en sus longitudes (ver Fig. 7 para mayores detalles del procedimiento). En el laboratorio, empezar desde el extremo superior de uno de los segmentos recolectados removiendo unos centímetros del leño con la finalidad de observar si el segmento del leño que queda sea más pequeño que la longitud máxima de los vasos de conducción. Luego, seguir el procedimiento de la Fig. 7.

Referencias sobre teoría, significado y bases de datos: Zimmermann and Jeje (1981); Brodribb and Hill (2000); Meinzer *et al.* (2001); Zwieniecki *et al.* (2001); Tyree and Zimmermann (2002); Sperry (2003); Cavender-Bares (2004); Maherali *et al.* (2004); Santiago *et al.* (2004); Holbrook and Zwieniecki (2005); Sperry *et al.* (2008a).

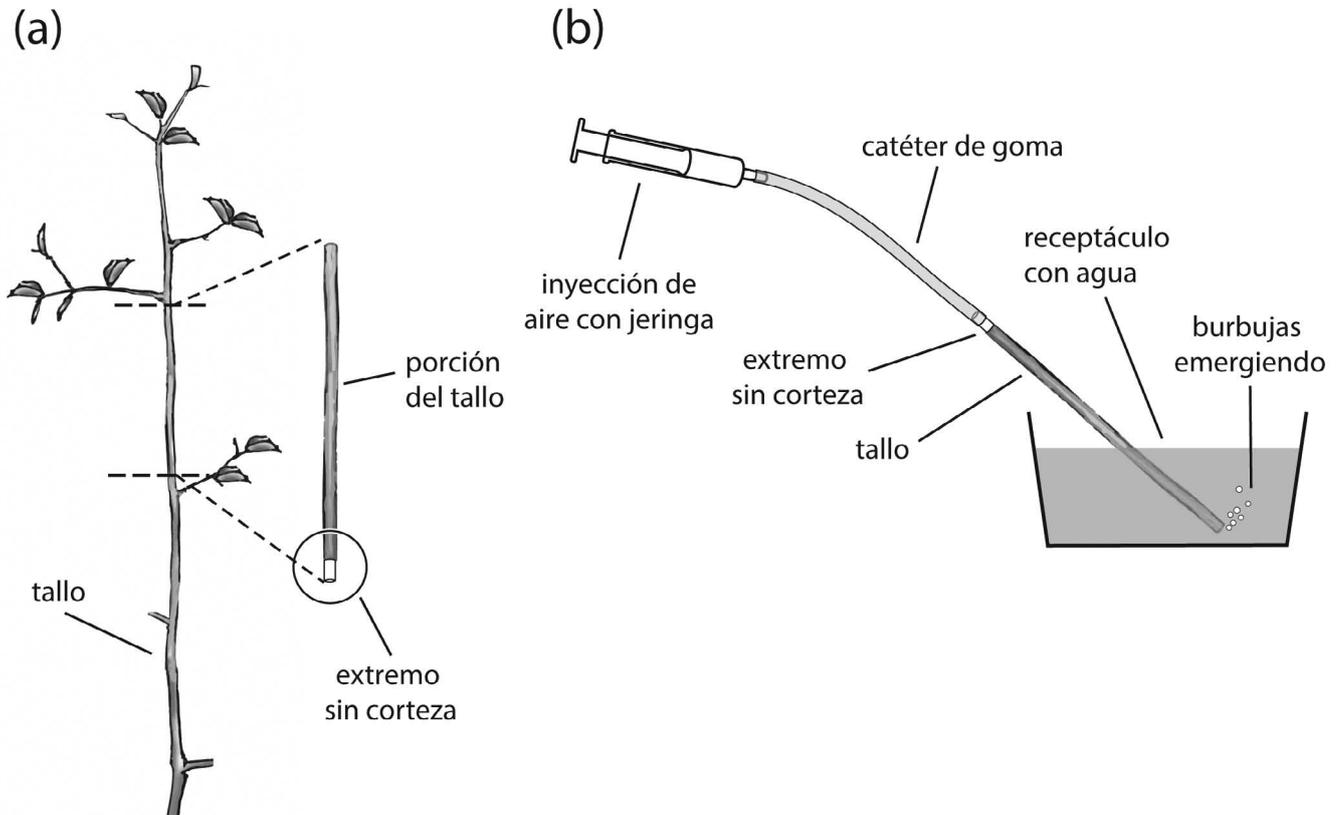


Fig. 7. Procedimiento para determinar el largo de los vasos. (a) Debe cortar un segmento de rama, de un largo que considere sea el largo probable de los vasos de la especie sobre la que está trabajando. (b) Del extremo basal de la rama cortada se debe retirar toda la corteza. Luego se debe colocar un catéter de goma, de un diámetro que se adapte de manera ajustada, cubriendo el extremo basal sin corteza. A continuación se debe introducir el extremo de una jeringa (de unos 50 ml) llena de aire en el extremo libre del catéter. Se debe entonces sumergir en agua el extremo distal de la rama (opuesto al extremo al que está sujeto el catéter) y, presionando suavemente el émbolo de la jeringa se generará en el catéter una presión apenas superior a la atmosférica. Si se observa que emergen burbujas del extremo sumergido de la rama, se considera que al menos un vaso ha sido cortado en sus extremos superior e inferior permitiendo que el aire se mueva libremente a lo largo del segmento de rama. Si no emergen burbujas, se debe proceder como se indica al final de este párrafo. El procedimiento se debe repetir usando largos de ramas progresivamente mayores, hasta encontrar el largo en el cual no emergen burbujas durante el procedimiento de aplicación de presión. De este último segmento (en el cual las burbujas no emergen) cortar delgadas rebanadas de la parte distal y realizar nuevamente la prueba, hasta encontrar un segmento en el cual las burbujas vuelven a emerger. Se considera que el largo del segmento encontrado con este procedimiento será apenas más corto que el largo del vaso más largo. Sin embargo, si del primer segmento que se corta no emergen burbujas, el vaso más largo de esa rama será más corto que el largo del segmento cortado, por lo que deben cortarse sucesivas piezas más cortas de ese mismo segmento hasta que emerjan burbujas. Luego de eso, se cortará un segmento apenas más largo que el anterior (pero del cual no se emitan burbujas cuando son puestos a prueba con este procedimiento) de manera de acercarse al largo máximo de vasos tal como se describe al final del procedimiento indicado más arriba.

Más bibliografía sobre métodos: Sperry *et al.* (1988); North and Nobel (1992); Alder *et al.* (1996); Kocacinar and Sage (2003); Sack and Holbrook (2006).

4.5 Vulnerabilidad al embolismo

La vulnerabilidad del xilema al embolismo es un indicador del riesgo de que se interrumpa el transporte del agua durante eventos de sequía. La vulnerabilidad se expresa

como el porcentaje de la conductancia del xilema que se pierde a un dado potencial hídrico del leño. El flujo de agua en los vasos de conducción está bajo tensión, la cual, en algunos casos, puede ser tan alta como 100 atmósferas de presión. Por lo tanto, cualquier entrada de aire dentro de los elementos de conducción dispararía la tensión dentro de ellos y se expandiría rápidamente (convirtiéndose en una embolia gaseosa), y así se bloquearía el flujo de agua a través de ellos.

Mientras mayor sea el desarrollo de la embolia, mayor es la pérdida de conductividad del xilema. La capacidad de las especies de tolerar potenciales hídricos altamente negativos (o sea, altas tensiones), sin que se produzca una embolia, varía enormemente entre las especies (cf. 3.15) y es un aspecto importante en la tolerancia a la sequía.

¿Qué recolectar y cómo hacerlo?

Siga las instrucciones de recolección del protocolo para medir la conductividad del xilema (4.4.).

Mediciones

La vulnerabilidad al embolismo es cuantificada a través de la construcción de una curva de vulnerabilidad del xilema. Este procedimiento consiste en graficar los valores medidos de la conductancia del xilema en el eje *y* en función de los valores de potencial hídrico (*Y*) correspondientes (a los cuales los valores de conductancia fueron obtenidos). La forma de esta curva es usualmente sigmoidea. Para caracterizar esta curva con un solo parámetro, comúnmente se utiliza el valor del potencial hídrico a la mitad de la curva (en general representa el 50% de pérdida de conductancia).

Para obtener diferentes valores de potencial hídrico del leño se pueden utilizar cualquiera de estos tres métodos:

- (1) *Deshidratación por evaporación.* Recolectar una rama grande que incluya algunas ramas laterales (ramas secundarias) y mantenerla en contacto con la atmósfera durante todo un día o más, para que el xilema se deshidrate progresivamente y se desarrolle una mayor tensión como consecuencia de que las hojas continúan transpirando. Mientras tanto, determinar el *Y* periódicamente con el método de la bomba de presión en las ramas secundarias, que serán removidas a ciertos intervalos de tiempo. Cuando se alcanza un valor en particular de *Y*, se debe medir la conductancia del eje principal de la rama también?, cercano al lugar donde se removió la última rama secundaria. Luego, generar una corriente de agua, a través del segmento del leño, brevemente, y bajo una presión lo suficientemente alta, como para remover las embolias gaseosas que se generaron en él (ver las referencias citadas). Medir nuevamente la conductancia para obtener la conductancia máxima de ese segmento. Este procedimiento nos permite calcular un valor de la pérdida de conductancia a un determinado valor de *Y*.
- (2) *Centrifugación.* Colocar un pequeño segmento de leño horizontal y simétricamente, en el rotor de una centrifuga y centrifugar las muestras de leño para generar una tensión en el agua dentro de los conductos del xilema. A partir de la fuerza centrifuga aplicada,

se puede inferir un correspondiente *Y* o *P* (negativo). La ventaja de este método es que se pueden generar rápidamente distintos potenciales hídricos a las muestras del leño. Sin embargo, la técnica es difícil para muestras de leño mayores a 20 cm, ya que las muestras que no pueden ser colocadas con seguridad en el rotor de la centrifuga y la longitud de los segmentos es mayor que el ancho del rotor de la centrifuga. Los detalles necesarios para la aplicación de este método se presentan en las referencias citadas.

- (3) *Inyección de aire.* Este es un método simple basado en el principio de sustituir la tensión interna por una presión positiva de aire externo, la cual es aplicada a un segmento de leño, que es colocado dentro de una cámara de presión. El procedimiento utiliza una cámara de presión especialmente diseñada para que un segmento de leño pase completamente a través de ella, permitiendo que se realicen las mediciones de conductancia mientras la presión externa es aplicada. Este tipo de cámara está disponible comercialmente en la compañía PMS Instrument CO, Albany, Oregon, USA (<http://pminstrument.com>).

Referencias sobre teoría, significado y bases de datos: Tyree and Sperry (1989); Davis *et al.* (2002); Brodribb *et al.* (2003); Maherali *et al.* (2004); Holbrook and Zwieniecki (2005); Choat *et al.* (2007); Feild and Balun (2008); Sperry *et al.* (2008a).

Más bibliografía sobre métodos: Cochard *et al.* (1992); Sperry *et al.* (1988); Sperry *et al.* (2008b); Alder *et al.* (1997); Pammenter and Vander Willigen (1998).

5 Caracteres de raíces y órganos subterráneos

La variación en los caracteres radicales entre especies tiene importantes consecuencias en el funcionamiento de esas especies. Las raíces finas son los órganos primarios para la absorción de agua y nutrientes, también son responsables de la transferencia de recursos entre las partes subterráneas y las aéreas. Las raíces finas pueden adquirir recursos directamente o a través de asociaciones con simbioses. Cuando las raíces finas acceden a los recursos del suelo directamente, pueden seleccionar los nutrientes minerales de un rango complejo de soluciones y partículas del suelo, mientras van modificando la química del suelo por medio de la exudación de un rango de compuestos. Las raíces también deben responder a la heterogeneidad de los recursos disponibles a múltiples escalas espaciales y temporales mientras resisten los ataques de un amplio rango de organismos y estreses ambientales.

No hay una sola solución evolutiva a todos los desafíos que impone adquirir los recursos del suelo en los diferentes ecosistemas. La medición de un número de caracteres radicales independientes combinados podría ayudar a

una mejor comprensión de las estrategias subterráneas de múltiples especies. Aquí describimos los tres grupos principales de caracteres que recomendamos medir

5.1 Longitud específica de la raíz

La longitud específica de la raíz (LER), o relación entre la longitud de la raíz y la biomasa seca de las raíces finas, es el carácter subterráneo análogo al área foliar específica (ver 3.1), y también representa una relación entre la unidad estándar de adquisición (longitud de la raíz) sobre la inversión del recurso en esa unidad (masa). Plantas con LER alta poseen mayor longitud de raíces para una inversión dada de biomasa seca y, generalmente, se considera que tienen tasas de adquisición de nutrientes y agua, y de crecimiento relativo más altas (por unidad de masa seca), mientras que presentan sobrevida de las raíces más bajas en comparación con las plantas con baja LER. No obstante, la LER alta puede ser el resultado de raíces de diámetro pequeño o densidad de tejidos bajo, características a su vez asociadas independientemente con diferentes caracteres. Por ejemplo, raíces finas ejercen fuerzas menos penetrante en el suelo y transportan menos agua, mientras que las raíces con tejidos de baja densidad son menos longevas pero tienen mayores tasas de absorción bajo condiciones de abundantes nutrientes. Puesto que hay muy poca diferencia operativa entre medir sólo LER o incluir la medición del diámetro y la densidad de las raíces recomendamos, al medir los caracteres funcionales de raíces, incluir estas mediciones.

¿Qué y cómo coleccionar?

A menudo se mide el conjunto de raíces de una planta para comparar sus raíces finas, sin embargo las raíces finas individuales o una cantidad pequeña de ellas pueden ser suficientes para medir el diámetro de las raíces, su biomasa o el orden de las ramificaciones. Una vez recolectadas las raíces finas, recomendamos separar las raíces finas de acuerdo con su edad y/o, si fuera de interés para responder preguntas específicas del estudio, también la profundidad del muestreo. Las raíces recolectadas en el campo típicamente abarcan un rango de edades, mientras que las raíces obtenidas dentro de tubos o provenientes de plantas jóvenes limitarían los rangos de edad. Las bases de la comparación que motiva las preguntas de cada estudio deben estar claramente determinadas y la obtención y preparación de las raíces debe ser adecuada a ellas en cada muestreo. Las raíces provenientes de los 20 centímetros superiores son la base estándar de la comparación, pero la profundidad real muestreada debería reflejar la variación en la altura debajo del suelo del cual se coleccionan las hojas.

En muestras de mezclas de especies, se debería rastrear el origen de las raíces finas para poder identificar con certeza

a qué especie pertenecen. Esto no es necesario en parches de vegetación uniformes o monoespecíficos, o cuando las raíces pueden ser distinguidas por sus características particulares entre una pequeña cantidad de especies. Para plantas pequeñas, a menudo es más factible excavar la planta entera para lavarla más tarde, y de esta forma facilitar la identificación de las raíces. Una cantidad estándar de raíces suficiente para realizar las mediciones generalmente es la que cabe en la palma de su mano. En general, es mejor tener una pequeña cantidad de raíces bien preparadas que una gran cantidad con menor calidad de preparación. Es preferible evitar individuos atípicamente grandes o atípicamente pequeños.

Almacenaje y procesamiento

Las raíces sin lavar generalmente pueden ser almacenadas bajo condiciones húmedas y frescas por una semana con mínima degradación de su estructura. Las técnicas de lavado deben ser poco agresivas para las especies con baja densidad de raíces, mientras que para raíces de alta densidad, en suelos con arcillas pesadas o materia orgánica que puede comprometer las mediciones, se pueden utilizar técnicas de lavado más rigurosas. El lavado de raíces de suelos arenosos puede requerir tan poco como treinta segundos bajo el agua corriente, mientras que el lavado de raíces del suelo rico en materia orgánica de la tundra podría requerir horas de limpieza meticulosa. En general, la limpieza de raíces requerirá una combinación de agua corriente sobre un tamiz de malla fina (0.2- 1 mm; para remover partículas finas y pesadas como arena), enjuagado en recipientes de agua (para remover partículas más gruesas y pesadas como guijarros), y extracción de restos con ayuda de pinzas (para remover contaminantes de similar tamaño y densidad que las raíces en estudio). A menudo es necesario masajear las raíces con los dedos y separar las raíces individuales para permitir la remoción de partículas. Si algunas partículas finas, como las arcillas, son muy difíciles de remover las raíces pueden ser quemadas a 650 ° C y luego sustraer el valor de la masa de cenizas de la biomasa seca bruta de raíces. Una regla práctica útil es detener el lavado de las raíces cuando le parece que está perdiendo tantas raíces finas como suelo está removiendo, o preferentemente un poco antes. Las raíces lavadas pueden ser almacenadas en una solución de etanol al 50 % por períodos más largos de tiempo.

Mediciones

En ocasiones es necesario separar las raíces saludables, y aparentemente vivas, de la muestra recientemente lavada. Las raíces vivas generalmente tienen un aspecto más claro y turgente comparado con las raíces muertas o senescentes

de la misma especie, que se ven más oscuras y blandas o deshidratadas. Debe tenerse en cuenta que en algunas especies las raíces vivas pueden no ser distinguibles de las muertas por su color. Puede ser útil observar un rango de edades y colores de raíces absorbentes para cada especie de planta a medir antes de realizar las mediciones, para poder identificar adecuadamente las raíces vivas y saludables. Para especies leñosas, las raíces a menudo se dividen por orden de ramificación para estandarizar mejor las comparaciones entre las especies.

Una vez que se prepararon las raíces se deben digitalizar las raíces y medir su longitud y diámetro para la determinación de los caracteres. La digitalización puede ser hecha con casi cualquier escáner. Un escáner con una resolución de 1600 dpi tiene una resolución de 15 μm que es la mitad del espesor de las raíces más finas de cualquier planta. Aun así, un escáner con menor resolución podría también servir. Se recomienda un escáner con un adaptador de transparencia, que ilumina los ítems en el escáner desde abajo, para obtener imágenes más nítidas de las raíces finas.

Las imágenes de las raíces se pueden capturar mejor si se sumergen las mismas en una pequeña cantidad de agua, esto también ayuda a desenredar las raíces individuales. Una bandeja de plástico transparente también sirve para ese fin. En general, no debería ser necesario teñir las raíces para obtener sus imágenes. Luego de escanearlas, las raíces deben ser secadas (48 horas a 60 ° C) y pesadas. Estas muestras de raíces también pueden ser molidas y analizadas para determinar su concentración de nutrientes.

Una vez que las raíces han sido escaneadas, se debe determinar de una fracción de la muestra la longitud y diámetro. Para un pequeño número de raíces esto puede ser hecho con un software de análisis de imágenes (ver 3.1 para datos de softwares libres). Para un mayor número de muestras o en el caso de raíces muy largas se recomienda la aplicación disponible comercialmente, WinRhizo (Régent Instruments). El software determinará automáticamente la longitud, diámetro y la distribución del volumen de las raíces de una muestra de longitud de raíces, lo que permitirá cálculos simples de LER, diámetro promedio de las raíces, y densidad del tejido radical (masa seca de raíces sobre volumen, este último derivado de la longitud y el radio). Aunque el software es caro para usos ocasionales, las raíces pueden ser escaneadas independientemente del análisis de software, guardadas en formato JPEG, y analizadas más tarde por alguien que tenga el software. Ver en el ítem *Casos Especiales y Extras* para métodos manuales cuando no está disponible ninguna de las facilidades mencionadas.

Casos especiales o extras

- (1) *Diámetro de la raíz y densidad de los tejidos radicales.*
No todas las raíces de un diámetro y densidad de tejidos

dado tienen estructura celular similar. Las raíces pueden variar en sus proporciones relativas de corteza y cilindro central (principalmente floema y xilema) y también en la forma en que estos tejidos se construyen. Por estas razones, de manera complementaria a la medición de la morfología de raíces finas, recomendamos realizar cortes transversales de las raíces medidas para determinar su estructura celular. Para ese fin, se deben seleccionar varias raíces de cada especie y se deben embeber en un polímero para luego realizar cortes con un micrótopo (en láminas de 4- μm). Los cortes se deben teñir con Azul de Toluidina (que tiñe a la lignina color azul-verdoso y a la celulosa púrpura a rojo-violeta), para luego montarse sobre un portaobjetos. Sobre los cortes se deben tomar imágenes digitales de cada especie utilizando un microscopio óptico a una magnificación de 100 x. Mediante software de análisis de imágenes se podrá determinar en los cortes las áreas correspondientes al cilindro central, el endodermo y los grandes elementos del xilema para luego calcular los diámetros de cada elemento, y las cantidades relativas de los diferentes tejidos en relación al área del corte transversal.

Referencias sobre la teoría, significancia y bases de datos: Eissenstat and Yanai (1997); Wahl and Ryser (2000); Steudle (2001); Pregitzer *et al.* (2002); Roumet *et al.* (2006); Craine (2009); Paula and Pausas (2011).

Más sobre metodología: Newman (1966); Tennant (1975); Böhm (1979); Fitter (1996); Bouma *et al.* (2000); Craine *et al.* (2001); Craine (2009).

5.2 Morfología del sistema radical

Las características del sistema radical completo pueden ser independientes de las raíces individuales y requieren ser medidas explícitamente. Hay tres caracteres principales de los sistemas radicales que recomendamos medir: la profundidad, la extensión lateral y la intensidad de exploración. Para la profundidad de la raíz la medición más simple es la determinación de la profundidad máxima de enraizamiento (la máxima profundidad del suelo desde la cual se pueden adquirir recursos, en un rango de unos pocos centímetros hasta decenas de metros). El máximo de extensión lateral de las raíces define la distancia desde el centro de la planta a la que las raíces pueden acceder para absorber recursos. Esta distancia también determina la habilidad de las plantas de interactuar con la heterogeneidad espacial en los recursos del suelo. Las cantidades de biomasa de raíces finas o la longitud de las raíces por unidad de volumen de suelo es una medida de la intensidad de la exploración del suelo, y de la habilidad de las especies para competir por esos recursos del suelo. La distribución de las raíces en el suelo tiene dos componentes,

la profundidad de esa distribución y la intensidad de la exploración del suelo. La distribución de las raíces a distinta profundidad es un indicador de la dependencia de las plantas sobre los recursos que se ubican a diferentes profundidades del suelo, y se relaciona con la distribución vertical de influencia de las plantas sobre la actividad del suelo. En general, es más simple determinar la biomasa radical a diferentes profundidades, pero comprender la relación entre la longitud radical y la profundidad es probablemente una mejor medida para entender la capacidad competitiva de absorción. En general, la biomasa de raíces y la longitud de las raíces a distinta profundidad estarían fuertemente correlacionadas si no hubiera cambios en la LER con la profundidad.

Debe tenerse en cuenta que la densidad del tejido radical y el diámetro radical están positivamente correlacionados con la longevidad de las raíces mientras que están negativamente correlacionados con la capacidad de absorción de nutrientes de las mismas. Además, la densidad de los tejidos radicales está positivamente correlacionada con la resistencia a los patógenos y a la sequía.

Recolección y análisis

La determinación de la extensión máxima de las raíces depende de las especies. Para algunas especies con raíces superficiales es razonable excavar la planta entera. Para especies de raíces más profundas, se debe cavar un pozo y hacer un corte transversal del suelo en una de las caras del pozo excavado. En algunos casos extremos, se debe acceder a las raíces desde cuevas o perforaciones.

La distribución en profundidad puede ser determinada cavando pozos si en un área de corte transversal conocido se puede cavar en profundidad. En esos pozos, una de las caras verticales debe ser alisada y sobre ella se debe remover una sección transversal con una pala plana. En esa sección transversal los sistemas radicales pueden removerse enteros o en secciones. En otros casos puede utilizarse un barreno de 5-10 cm de diámetro para remover la biomasa radical más profunda. La típica distribución de las raíces en profundidad sigue una relación exponencial. Una selección estándar de profundidades de extracción sería 5, 10, 15, 20, 40, 80, 120 y 200 cm de profundidad, para sistemas radicales limitados principalmente a los 2 m superiores del suelo. Para estimar la máxima profundidad de enraizamiento en especies con mayor profundidad de raíces, se pueden usar distribuciones incompletas de profundidad de raíces pero la confiabilidad de esta estimación va a depender del patrón de biomasa radical en la profundidad. Para algunas especies, la distribución de las raíces en profundidad puede ser determinada al azar en relación al individuo, o en relación al punto que representa el punto medio de extensión lateral del individuo. Sin embargo, la biomasa radical tendrá que ser determinada directamente

debajo de los individuos, al menos para especies con raíz principal. Para determinar la extensión de los sistemas radicales, se debe excavar una franja horizontal del suelo, comenzando desde el centro de la planta, para rastrear las raíces. En otros casos, si los individuos están apiñados, se puede considerar que la extensión lateral de las raíces es equivalente a la mitad de la distancia interplanta, pero esto debería ser verificado.

Una vez que los suelos se han excavado y las raíces han sido extraídas, el almacenamiento y lavado de las raíces debe seguir los mismos protocolos descritos previamente. A los sistemas radicales intactos es mejor extenderlos sobre un tamiz grande para lavarlos con agua corriente y/o sumergirlos en cubas con agua. Es posible que para confirmar la identidad de las raíces recolectadas se requieran comparaciones anatómicas o moleculares con otras raíces de la especie seleccionada. Esto puede evitarse rastreando las raíces hacia sus partes aéreas o muestreando parches monoespecíficos. Si se van a determinar las distribuciones en profundidad, las raíces finas (< 2 mm) y gruesas deberían separarse. Luego, las submuestras de raíces finas limpias pueden ser escaneadas, si se desea, para analizar diámetro, longitud, y volumen. De todas formas, la biomasa radical debe secarse y pesarse para obtener el dato de distribución de la biomasa en el perfil del suelo.

Casos especiales o extras

- (1) *Arbustos grandes o árboles.* Cuando se realiza el muestreo de arbustos grandes y en árboles, el investigador se va a encontrar con raíces leñosas gruesas. En esos casos puede ser necesario un taladro o barreno de madera para cortar fracciones de dichas raíces (que son obviamente importantes para el soporte mecánico y/o el almacenamiento de recursos, y que usualmente exceden los 10 cm de diámetro). Estas secciones de raíces gruesas se conservan mejor separadas de las secciones de raíces relativamente finas. Luego, todas las raíces extraídas pueden ser combinadas para ciertos análisis.
- (2) *Suelos arcillosos.* Si el suelo es particularmente arcilloso, conglomerado, o contiene carbonato de calcio, considere agregar un agente dispersante (por ejemplo hexametáfosfato de sodio) para el lavado de las raíces. El mejor aditivo para el lavado varía dependiendo de las condiciones particulares del suelo.

Referencias sobre la teoría y la significancia: Adiku *et al.* (2000); Zwieniecki *et al.* (2002); Hodge (2004); Schenk and Jackson (2002); Dunbabin *et al.* (2004); Withington *et al.* (2006); Craine (2009); Lambers *et al.* (2011).

Más bibliografía sobre los métodos: Böhm (1979); Caldwell and Virginia (1989); Jackson (1999); Linder *et al.* (2000); Schenk and Jackson (2002).

5.3 Estrategia de absorción de nutrientes

El rendimiento o desempeño de diferentes especies en ecosistemas limitados en nutrientes es indudablemente afectado por las diferencias interespecíficas inherentes en la capacidad de absorción de nutrientes. Un factor que afecta esta capacidad es la LER (ver 5.1.); sin embargo, otros factores como por ejemplo las diferencias cuantitativas en la afinidad del sistema transportador de iones también afectan la capacidad de absorción de nutrientes. Más aún, muchas plantas explotan las asociaciones simbióticas con bacterias u hongos para mejorar su habilidad competitiva para absorber nutrientes. Este último es el tópico de la presente sección.

En general, la mayoría de las especies de plantas presenta simbiosis con bacterias fijadoras de N₂ u hongos micorrícicos. Sin embargo, la literatura está fuertemente parcializada hacia especies templadas de Europa y Norteamérica. Hay todavía mucho por estudiar acerca de las estrategias de absorción de nutrientes en especies en otras regiones, tal como lo demuestra el reciente hallazgo de raíces especializadas en absorción de N en zonas cubiertas con nieve en el Cáucaso. En este texto proveemos protocolos específicos en el *Material Suplementario 2*, tratando las siguientes estrategias:

- 1) *Bacterias fijadoras de Nitrógeno*: asociación con bacterias en nódulos para fijar el N₂ atmosférico.
- 2) *Micorrizas arbusculares*: simbiosis con hongos micorrícicos arbusculares para ayudar en la adquisición de nutrientes y agua.
- 3) *Ectomicorrizas*: simbiosis con hongos ectomicorrícicos para ayudar en la absorción de nutrientes inorgánicos y formas orgánicas de N
- 4) *Micorrizas ericoides*: simbiosis con hongos micorrícicos ericoides para ayudar en la absorción de las formas orgánicas del N.
- 5) *Orquídeas*: simbiosis con hongos micorrícicos orquidioides para la adquisición de nutrientes desde la hojarasca
- 6) *Tipos más raros de micorrizas*, por ejemplo micorrizas arbutoides (*Arbutus*, *Arctostaphylos*), ectoendomicorrizas (algunas gimnospermas) y micorrizas piroloides (Pyrolaceae)
- 7) *Plantas micoheterotróficas sin clorofila* que extraen carbono y probablemente la mayoría de los nutrientes de la materia orgánica muerta a través de hongos micorrícicos.
- 8) *Plantas verdes hemiparásitas de raíz/tallo*, como el muérdago (Loranthaceae), que extrae nutrientes como N y P de las raíces o tallos de su planta huésped.
- 9) *Plantas holoparásitas*: sin clorofila que extraen el carbono y nutrientes directamente de una planta huésped.
- 10) *Plantas carnívoras* que capturan formas orgánicas de N y P de animales.

- 11) *Raíces proteoides, raíces dauciformes y capilares* en juncos.
- 12) *Otras estrategias especializadas* (mayormente en epífitas) incluyen:
 - a) Plantas de estanques- captura y almacenamiento de nutrientes y agua
 - b) Canastas- captura y almacenamiento de nutrientes y agua
 - c) Nidos de hormigas- Absorción y almacenamiento de nutrientes
 - d) Tricomatas- captura de nutrientes y agua a través de hojas bromelioides
 - e) Velamen radical- captura, absorción y almacenamiento de nutrientes y agua
- 13) *Ninguna*: no hay mecanismos especializados evidentes para la absorción de N o P; la absorción se hace, presumiblemente, directamente a través de pelos radicales (o a través de hojas, por ejemplo en el caso de ciertos helechos con frondas muy finas)

Aunque mucho del trabajo experimental sobre la absorción de nutrientes activa por las raíces ha sido hecho sobre plantas de interés agrícola, hay alguna información disponible sobre esto en plantas silvestres, pero nuevamente, relativamente poco para especies tropicales o subtropicales. Las técnicas con radioisótopos para caracterización de los mecanismos de transporte de iones están dentro del alcance de este manual, pero puede ser más sencillo consultar literatura sobre transporte de iones.

Referencias sobre la teoría y la significancia: ver Material Suplementario 2; además, para más información sobre raíces especializadas de ambientes con nieve ver Onipchenko et al. (2009).

6 Caracteres regenerativos

6.1 Síndrome de dispersión

El modo de dispersión de un “propágulo” (i.e. unidad de la semilla, fruto o espora que es dispersada) tiene consecuencias obvias en la distancia que éste recorre, la ruta que recorre y en su destino final.

¿Cómo se clasifica?

El modo de dispersión es un carácter categórico. El registro en orden decreciente de importancia de todos los síndromes que puede asumir una semilla se muestran en la Caja 4. Si una especie presenta varios síndromes de dispersión con similar importancia, se debe priorizar el que se presume contribuye a una mayor distancia de dispersión; ej. la dispersión por viento se prioriza por sobre la dispersión por hormigas.

Es importante tener en cuenta que el propágulo puede, ocasionalmente, ser transportado por uno de los modos abajo

mencionado aun cuando no presenta adaptaciones obvias para ello. Esto es particularmente común para la dispersión por endo y exozoocoria. Tenga en cuenta que existe una amplia literatura (ej. en *Floras*) en las que se precisa el modo de dispersión de muchos taxa.

Referencias sobre teoría, el significado y bases de datos: Howe and Smallwood (1982); Van der Pijl (1982); Bakker *et al.* (1996); Howe and Westley (1997); Hulme (1998); Poschlod *et al.* (2000); McIntyre and Lavorel (2001); Tackenberg *et al.* (2003); Myers *et al.* (2004).

Más sobre métodos: Howe and Westley (1997); Forget and Wenny (2005); Pons and Pausas (2007).

6.2 Tamaño y forma del propágulo

En este caso se debe tener en cuenta toda la estructura reproductiva que se dispersa (= propágulo o estructura de dispersión) y que entra en el suelo. El propágulo se puede corresponder con la semilla; sin embargo, en muchas especies, éste constituye la semilla más las estructuras que la rodean, por ejemplo el fruto. El tamaño del propágulo es el peso seco luego de que el mismo es secado en estufa. La forma del propágulo es la varianza en sus tres dimensiones, es decir, el largo, el ancho y el alto del propágulo, cada uno dividido por el mayor de los tres valores. La varianza va de 0 a 1 y es sin unidades. Los propágulos pequeños, con bajos

valores de varianza en su forma (relativamente esféricos), tienden a enterrarse profundo en el suelo y permanecer por mucho tiempo en el banco de semillas. El tamaño y la forma de la semilla son entonces fundamentales para la persistencia de la semilla en el suelo (persistencia del banco de semillas).

¿Cómo y cuándo se colecta?

Los mismos tipos de individuos que se seleccionaron para medir los caracteres de hojas y la altura de la planta deberán ser muestreados para la medición de los propágulos. Como el interés de este carácter está en la estructura que llega y entra al suelo, se deben remover sólo las partes de la unidad que se desprenden fácilmente (ej. papus), mientras que partes como alas y aristas permanecerán adheridas. La pulpa de los frutos carnosos también debe ser removida, ya que la semilla es la unidad que entra al suelo en esos casos (sobre todo si el fruto ha pasado por el tracto digestivo de un animal previamente). Las semillas (o propágulos) deben ser maduros y estar vivos. Los propágulos pueden ser recogidos directamente de la planta o bien de la superficie del suelo.

Almacenamiento y procesado

Almacenar los propágulos en bolsas plásticas selladas y guardar en una habitación fresca o en heladera hasta su

Caja 4. Síndromes de dispersión

- 1- Dispersión no asistida; la semilla o fruto no presentan una asistencia obvia para la su transporte a larga distancia y simplemente caen de forma pasiva de la planta.
- 2- Dispersión por viento (anemocoria); incluye (A) pequeñas semillas como polvo (ej. *Pyrola*, *Orchidaceae*), (B) semillas con papus u otros pelos largos (ej. sauce (*Salix*), álamos (*Populus*), muchas *Asteraceae*), 'globos' o comas (tricomas en el extremo de la semilla), (C) frutos aplanados o semillas con alas grandes, como las que se encuentran en muchos arbustos y árboles (ej. *Acer*, abedul (*Betula*), fresno (*Fraxinus*), tilo (*Tilia*), olmo (*Ulmus*), pino (*Pinus*)); esporas de helechos y criptógamas vasculares relacionadas (*Pteridophyta*) y (D) planta rodadora, donde toda la planta o la infrutescencia con semillas maduras es arrastrada por el suelo por la fuerza del viento distribuyendo las semillas. Esta estrategia es conocida en especies de regiones áridas, ej. *Baptisia lanceolata* en el sureste de Estados Unidos y en *Anastatica hierochuntica* (rosa de Jericó) en el norte de África y en Oriente Medio.
- 3- Transporte en interior de animales (endozoocoria), ej. por aves, mamíferos, murciélagos; muchas carnosas, frecuentemente bayas bien coloreadas, semillas con arilo, drupas y frutos grandes (frecuentemente bien coloreados) que son consumidos por vertebrados y pasan a través de su sistema digestivo antes de que la semilla entre al suelo (ej. acebos (*Ilex*), manzano (*Apple*)).
- 4- Transporte en exterior de animales (exozoocoria); frutos y semillas que se adhieren a animales, ej. al pelaje del animal, plumas, pico, patas, adheridas mediante apéndices como ganchos, púas, aristas, sustancias pegajosas (ej. amor seco (*Bidens*), muchas gramíneas).
- 5- Dispersión por acopio; semillas marrones o verdes, nueces que son acumuladas y enterradas por mamíferos o aves. Duras, de paredes gruesas, indehiscentes tienden a ser acumuladas por mamíferos (ej. avellanas (*Corylus*) acopiadas por ardillas) y semillas redondeadas sin alas acopiadas por aves (ej. bellota (*Quercus* spp.) por arrendajos).
- 6- Dispersión por hormigas (myrmecocoria); dispérsulos con eliosomas (apéndices nutricionales especializados) que las hacen atractivas para ser capturadas, transportadas y utilizadas por hormigas u otros insectos.
- 7- Dispersión por agua (hidrocoria); los dispérsulos están adaptados para permanecer a flote en el agua por largo tiempo, ayudados por tejidos suberosos y bajo peso específico (ej. fruto del coco).
- 8- Dispersión por lanzamiento, semillas contenidas en el fruto y luego lanzadas lejos de la planta por "explosión" al momento de la apertura de la cápsula (ej. *Impatiens*).
- 9- Contracción de pelos, la contracción de pelos higroscópicos presentes en el dispérsulo provoca el movimiento de la semilla ante cambios en la humedad de ambiente.

procesado. Procesar el material lo antes posible. Para propágulos que se dispersan secos, el almacenamiento en un lugar seco también es efectivo.

Medición

Remover frutos carnosos, papus u otras partes que se caen fácilmente (ver arriba en la presente Sección). Luego, tomar el valor de cada dimensión utilizando un calibre o un microscopio binocular y calcular la varianza (largo, ancho y alto). Luego secar a 60°C por al menos 72 horas (o a 80°C por 48 horas) y pesar (=tamaño del propágulo).

Casos especiales o extras

Recomendamos complementar la medición de este carácter con la valoración de otros caracteres, directa o indirectamente relacionados al banco de semillas o de plántulas, para una mejor evaluación de la estrategia regenerativa de la especie. Para la valoración del banco de semillas existen buenos métodos (ver *Más sobre Métodos* más abajo en la presente sección). Además, la determinación del banco de semillas de especies serótinas en ecosistemas propensos al fuego (ej. *Pinus* y Proteaceae como *Banksia*, *Hakea* y *Protea*) y de bancos de plántulas de larga vida de especies leñosas del sotobosque pueden también ser importantes para la comprensión de las estrategias regenerativas de las especies. La viviparidad como en algunos manglares también pueden ser incluido en esta valoración.

Referencias sobre teoría, el significado y bases de datos: Hendry and Grime (1993); Thompson *et al.* (1993, 1997); Leishman and Westoby (1998); Funes *et al.* (1999); Weiher *et al.* (1999); Peco *et al.* (2003).

Más sobre métodos: Hendry and Grime (1993); Thompson *et al.* (1993, 1997); Weiher *et al.* (1999); Pons and Pausas (2007).

6.3 Potencial de dispersión

El potencial de dispersión es definido como la proporción de propágulos producidos por un individuo que viajan a una cierta distancia, que puede ser elegida arbitrariamente dependiendo de los objetivos del trabajo. El propágulo puede ser la semilla o el fruto o un propágulo vegetativo. En contraste con el síndrome de dispersión, el potencial de dispersión permite cuantificar la dispersabilidad de una semilla en relación a la distancia que recorre. El potencial de dispersión varía no solo entre especies con distinto síndrome de dispersión, sino también entre especies con el mismo síndrome de dispersión. Por consiguiente, es una variable crucial cuando nos preguntamos si la dispersión es un factor limitante de la ocurrencia de una especie en un hábitat

favorable o de la riqueza de especies en una comunidad, o incluso si la fragmentación es un peligro para la supervivencia de especies o poblaciones. La capacidad de supervivencia en ambientes disturbados o fragmentados está frecuentemente relacionada con una alta capacidad de dispersión. Tanto la capacidad de dispersión como las características de las semillas pueden estar correlacionadas con el potencial de dispersión. Cuantas más semillas son producidas, mayor es la probabilidad de que una alcance una gran distancia. Las características de las semillas como por ejemplo su masa, forma y estructuras de la superficie, responsables de la dispersión, dependen del vector de dispersión. Aquí puede haber un compromiso entre el potencial de dispersión (en el espacio) y el máximo tiempo de vida así como con la persistencia en el banco de semillas (dispersión en el tiempo). Las especies de larga vida generalmente exhiben un menor potencial de dispersión que las especies con un banco de semillas persistente por largo tiempo.

¿Cómo se registra?

El potencial de dispersión es una variable continua y puede ser medido tanto por mediciones directas en el terreno como a través de la identificación y medición de caracteres relacionados a la capacidad de dispersión, e incluso por aproximaciones mediante modelos. El potencial de dispersión por el viento está correlacionado con la altura a la que se libera el propágulo y con la velocidad terminal (ver abajo), el potencial de dispersión por agua está correlacionado con la flotabilidad del propágulo, y el potencial de dispersión por animales por la capacidad de adherencia o por la capacidad de supervivencia luego del paso por el tracto digestivo del propágulo. La dispersión por humanos, máquinas o vehículos es muy compleja. La medición de la capacidad de dispersión, por lo tanto, requiere de estudios que se adapten a las condiciones específicas.

Las mediciones deben ser tomadas sobre el propágulo intacto, por ejemplo semillas o frutos con todas las estructuras, como papus y aristas, que están adheridas al momento de su liberación. Debe medirse la altura de liberación de los propágulos, que será la diferencia entre la mayor altura en la que se encuentra la semilla o fruto y la base de la planta. La velocidad terminal se mide sobre propágulos recién colectados y secados al aire, como la velocidad de caída real en una condición sin aire en movimiento. La capacidad de flotabilidad (proporción de propágulos que flotan luego de un tiempo definido) es medida poniendo los propágulos en recipientes de vidrio y éstos sobre un agitador de matraces con una frecuencia de 100min⁻¹. La capacidad de adherencia (proporción de propágulos que permanecen adheridos luego de un tiempo definido) es medida adhiriendo semillas a la piel de determinado animal; la misma es luego, agitada mediante una máquina. La supervivencia, luego de la digestión, se puede medir tanto por experimentos que

consisten en pasar las semillas a través del tracto digestivo mediante experimentos en donde se simula la ingestión y la digestión a través de tratamientos químicos estandarizados. Estos últimos tienen que ser calibrados con experimentos de digestión.

Para evaluar la dispersión potencial por animales, en la medida de lo posible, deben realizarse estudios de campo ya que el comportamiento de los animales (ej. selección de especies por animales herbívoros) puede influenciar fuertemente el potencial de dispersión, comparado con el determinado en una simulación con un fragmento de piel animal. Predecir el potencial de dispersión por animales requiere de modelos basados en procesos con una capacidad predictiva en un amplio rango de escenarios.

Casos especiales o extras

- (1) *Para plantas acuáticas*, la altura de liberación de la semilla es la distancia entre el punto más alto de la semilla o fruto y la superficie del agua.
- (2) *Procesos secundarios*, ej. la dispersión secundaria por el viento, puede afectar fuertemente al proceso de dispersión. Estos procesos suelen ser obvios sólo cuando se realizan estudios de campo y pueden requerir el desarrollo de métodos particulares adicionales.

Referencias sobre teoría, el significado y bases de datos: Bruun and Poschlod (2006); Poschlod *et al.* (1998, 2005) Tackenberg (2003); Tackenberg *et al.* (2003); Schurr *et al.* (2005); Will and Tackenberg (2008); Cousens *et al.* (2010).

Más sobre métodos: Fischer *et al.* (1996); Römermann *et al.* (2005a, 2005b, 2005c).

6.4 Masa de semillas

La masa de semillas, también llamada tamaño de semilla, es la masa de una semilla secada en estufa, expresada en mg. En semillas grandes, los recursos almacenados pueden ayudar a la plántula a sobrevivir y establecerse en ambientes peligrosos (ej. ambientes con poca luz, con estrés hídrico o con herbivoría). Por su parte, las semillas pequeñas pueden ser producidas en gran número con el mismo esfuerzo reproductivo. Las semillas pequeñas también tienden a ser enterradas en el suelo, particularmente si su forma es más bien esférica, lo que favorece a su longevidad en el banco de semillas. La variación interespecífica en la masa de la semilla también es importante desde el punto de vista taxonómico, taxa más relacionados tenderán a ser más parecidos en cuanto a la masa de la semilla.

¿Cómo y cuándo se colecta?

Los mismos tipos de individuos seleccionados para los caracteres de hojas o altura de la planta deberían ser

muestreados para la medición de este caracteres (ver 3.1.). Las semillas deberán estar vivas y bien maduras. Si la forma de la unidad de dispersión (ej. semilla, fruto) es también medida (ver Sección 6.2 arriba), no se debe remover ninguna estructura hasta que la medición del propágulo haya finalizado. Recomendamos recolectar al menos 10 semillas de por lo menos 10 individuos por especie, aunque son preferibles más individuos por especie. Dependiendo de la precisión de la balanza disponible, para algunas especies con semillas pequeñas (ej. orquídeas) 100 o 1000 semillas pueden ser necesarias.

Almacenamiento y procesado

Si la forma del propágulo es también medida, recomendamos almacenar los dispéculos en bolsas de plástico selladas herméticamente, envuelto o no en papel húmedo (ver Sección 3.1) y procesar y medir lo antes posible. El secado al aire también puede resultar adecuado.

Medición

Luego de la medición de la forma del propágulo se deben remover los accesorios (alas, pappus, eliosomas, pulpa de frutos, etc.), con cuidado de no remover la cubierta seminal en el proceso. En otras palabras, en primer lugar es sumamente importante definir qué partes corresponden al propágulo y cuales a la semilla propiamente dicha. Se debe dejar el fruto intacto cuando las estructuras del propágulo sean inseparables de la semilla propiamente dicha. Pesar las semillas (o aquenios, frutos con una semilla) secadas a 80°C por al menos 48 hs. (o hasta alcanzar un peso constante en semillas muy grandes o con cubierta dura). Ser conscientes de que una vez extraídas de la estufa las semillas toman humedad del aire. Si no se pesan inmediatamente se deben poner en un desecador antes de ser pesadas o poner nuevamente en estufa. Es importante tener en cuenta que el número medio de semillas por planta (cinco o 1000 semillas) cuenta como una observación estadística a la hora de realizar los cálculos de media, desviación o error estándar.

Casos especiales o extras

- (1) *Variación dentro del individuo*. Tener en cuenta que el tamaño de la semilla puede variar más dentro de un individuo que entre individuos de la misma especie. Asegurarse de colectar semillas de "tamaño medio" de cada individuo y evitar las de tamaño o muy pequeño o muy grande.
- (2) *Bases de datos accesibles*. Tener en cuenta que existen numerosas bases de datos con información sobre masa de semillas que están accesibles en la literatura y/o que se puede acceder bajo ciertas condiciones. Tener en

cuenta, sin embargo, que las metodologías utilizadas para el registro de este carácter en distintas bases de datos pueden no ser las mismas.

- (3) *Volumen de la semilla*. Existen importantes bases de datos con información sobre el volumen de las semillas, frecuentemente medidos como $\pi/6 \times L1 \times L2 \times L3$ (asumiendo una forma elipsoidal). Utilizando las ecuaciones de calibración apropiadas esos datos también pueden ser utilizados. Muchas de esas bases de datos incluyen actualmente masa además de volumen de las semillas.

Referencias sobre teoría, el significado y bases de datos: Mazer (1989); Seiwa and Kikuzawa (1996); Reich *et al.* (1998); Cornelissen (1999); Leishman *et al.* (2000); Westoby *et al.* (2002); Moles *et al.* (2005); Moles and Westoby (2006); Wright *et al.* (2007).

Más sobre métodos: Hendry and Grime (1993); Thompson *et al.* (1997); Westoby (1998); Weiher *et al.* (1999); Wright *et al.* (2007).

6.5 Morfología funcional de la plántula

Los tipos funcionales de plántulas se refieren a la morfología de la plántula en relación a la función y posición de los cotiledones. El tipo funcional de plántula es un carácter categórico que puede ser utilizado para caracterizar la estrategia regenerativa de la planta. La distribución de los caracteres de plántulas entre familias de plantas es poco conocida, a pesar de que la importancia de los caracteres de plántulas en sistemática se reconocen desde hace tiempo. El presente carácter ha sido creado sobre la base de especies leñosas (árboles y arbustos) y ha sido especialmente utilizado en bosques tropicales. Garwood (1996) estableció los siguientes cinco categorías de plántulas basadas en tres características del cotiledón con supuesta importancia ecológica (posición, textura y exposición) (Fig. 8):

- (1) Criptocotilar hipogeo con cotiledones de tipo reservante (con almacenamiento de reservas) (CHR por su sigla en inglés),
- (2) Criptocotilar epigeo de tipo reservante (con almacenamiento de reservas) (CER),
- (3) Fanerocotilar epigeo con cotiledones foliáceos (PEF),
- (4) Fanerocotilar epigeo con cotiledones de tipo reservante (PER) y
- (5) Fanerocotilar hipogeo con cotiledones de tipo reservante (PHR).

Estas categorías son el resultado de la combinación de las diferentes posibilidades en relación a la exposición del cotiledón (criptocotilar o fanerocotilar), posición (epigeo o hipogeo) y a su función (foliáceo o con almacenamiento de reservas). Si bien con estas dicotomías las combinaciones

potencialmente posibles serían ocho una plántula con cotiledón criptógamo y folioso no es biológicamente posible, y el tipo fanerocotilar hipogeo folioso no ha sido reportado hasta el momento. Los tipos morfo-funcionales de plántulas han sido relacionados con otros caracteres de las plantas como tamaño de semilla; ej. semillas de gran tamaño están relacionadas con plántulas con cotiledones de tipo reservante, mientras que semillas pequeñas con cotiledones foliosos y fotosintetizantes. Teniendo en cuenta que los tipos de plántulas mencionados arriba han sido observados particularmente en bosques tropicales, la ocurrencia y proporción de cada uno en otros ecosistemas debe ser estudiado.

¿Cómo y cuándo se colecta?

Teniendo en cuenta que este no es un carácter plástico, recomendamos poner a germinar suficientes semillas como para garantizar al menos cinco plántulas por especie. Se deben seleccionar semillas sin evidencias de, por ejemplo, daño por patógenos y/o predación.

Medición

La morfología de la plántula (exposición, posición y función del cotiledón) debería ser descripta cuando al menos cinco individuos hayan desplegado al menos tres hojas cada uno. Luego de esto las especies son asignadas a una de las categorías indicadas arriba en la presente sección y según se describe a continuación (ver también Fig. 8):

- *exposición del cotiledón*: será fanerocotilar si la cubierta seminal se abre y ambos cotiledones emergen de la semilla, criptocotilar si permanecen dentro de la semilla.
- *posición del cotiledón*: será epigeo cuando el hipocótilo se desarrolla al menos 2 cm por sobre la superficie del suelo, e hipogeo cuando el hipocótilo se desarrolla sobre la superficie del suelo.
- *función del cotiledón*: son cotiledones de reserva cuando son carnosos o gordos, y cotiledones foliáceos (también llamado paracotiledón) cuando son primariamente fotosintetizante.

Casos especiales y extras

- (1) *Clorofila en cotiledones carnosos*. En muchos casos los cotiledones carnosos contienen clorofila, sin embargo son considerados como órganos de reserva (ej. *Aspidosperma* spp.).

Referencias sobre teoría, el significado y bases de datos: Ng (1978); De Vogel (1980); Hladik and Miquel (1990);

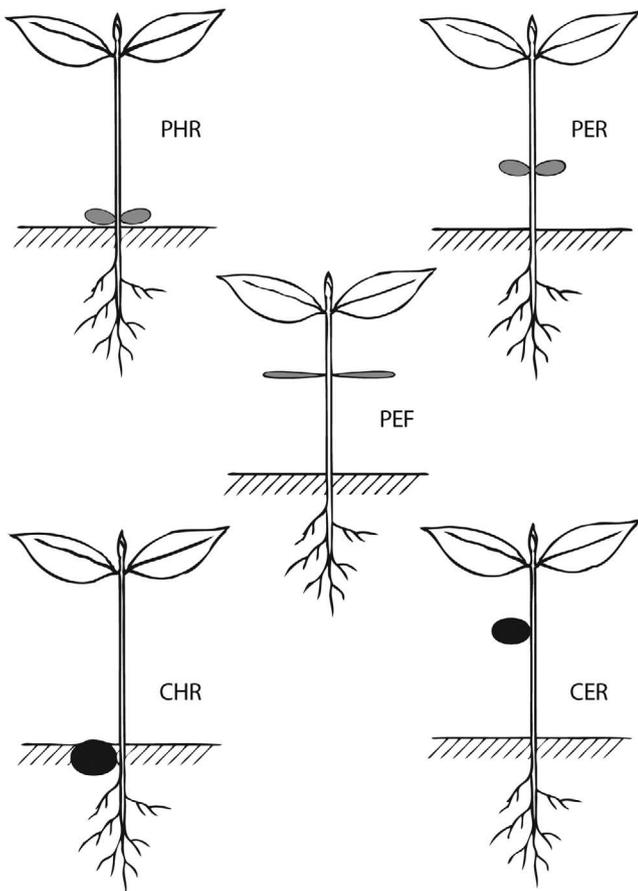


Fig. 8. Tipos funcionales de plántulas. En la sección 6.4 (sobre Morfología funcional de plántulas) se describen 5 tipos funcionales de plantas (en el dibujo las hojas se indican en blanco, los cotiledones en gris y las semillas en negro): PHR = Fanerocotilar hipógeo con cotiledones reservantes; PER = Fanerocotilar epígeo con cotiledones reservantes; PEF = Fanerocotilar epígeo con cotiledones foliosos; CHR = Criptocotilar hipógeo con cotiledones reservantes; y CER = Criptocotilar epígeo con cotiledones reservantes.

Garwood (1996); Kitajima (1996); Wright *et al.* (2000); Ibarra-Manriquez *et al.* (2001); Zanne *et al.* (2005); Leck *et al.* (2008).

6.6 Capacidad de rebrote luego de un disturbio

La capacidad de una especie de planta para rebrotar luego de la destrucción de gran parte de su biomasa aérea es un importante atributo para la persistencia en determinados ecosistemas donde existen recurrentemente fuertes disturbios. El fuego (natural o antrópico), la fuerza del viento de los huracanes y la tala son los disturbios más frecuentes y extendidos. Sin embargo, las sequías extremas o los eventos de heladas, el pastoreo severo, el deterioro por grandes herbívoros, deslizamientos de tierra, inundaciones y otros eventos de erosión de corto tiempo pero

a gran escala también importan. Existe un compromiso en los atributos funcionales entre especies con capacidad de rebrote y aquellas que no poseen dicha capacidad. Comparadas con las especies sin capacidad de rebrote, las que pueden rebrotar tienden a mostrar mayor asignación de carbohidratos a órganos subterráneos (o en órganos de almacenamiento en la superficie del suelo); sin embargo, su crecimiento en biomasa tiende a ser menor, y su capacidad reproductiva baja. La contribución de las especies con capacidad de rebrote en la composición de especies de la comunidad tiende a estar asociada con la probabilidad de ocurrencia de eventos que destruyan la biomasa aérea.

¿Cómo se registra?

Aquí definimos la capacidad de rebrote como la habilidad relativa de una especie para formar nuevos brotes luego de la destrucción de gran parte de su biomasa aérea, utilizando reservas de las partes basales o subterráneas del individuo. El siguiente método representa un compromiso entre su aplicabilidad general, el tiempo que demanda su medición por un lado y la precisión del mismo. Es particularmente relevante para leñosas y gramíneas, pero también puede ser aplicado en herbáceas. Dentro del sitio de estudio se deben buscar puntos en donde haya evidencias claras de eventos recientes de disturbio. En general, esos eventos deberían haber ocurrido dentro del mismo año del estudio. Sin embargo, si se consideran sólo especies leñosas, las mediciones pueden realizarse luego de 5 años de pasado el disturbio (siempre que el brote emerja cerca de la superficie del suelo se puede considerar como un rebrote luego de un disturbio). Por cada especie, se deben identificar entre 5 y 50 individuos adultos (dependiendo del tiempo disponible de búsqueda) en los cuales al menos el 75% de la biomasa aérea haya sido destruida, incluyendo la totalidad de la biomasa verde. Esto asegura que el rebrote se produce a partir de órganos de reserva subterráneos o de la superficie del suelo. Tenga en cuenta que en el caso de plantas leñosas, los troncos y ramas viejas, con el xilema muerto no son considerados como parte de la biomasa viva. Así, si un árbol permanece en pie luego de un fuego, pero con toda su corteza, el cambium y el xilema joven muertos debería ser considerado como con destrucción del 100% de su biomasa aérea.

Verificar si ha transcurrido suficiente tiempo desde el disturbio como para que el rebrote sea posible. Estimar (aproximadamente) el porcentaje medio de biomasa aérea destruida en esas plantas (una estimación de la severidad del disturbio) por comparación con individuos adultos de la misma especie no afectados. Multiplicar ese porcentaje por el porcentaje de individuos de la población que rebrotaron (ej. formaron nuevos brotes que emergieron de porciones basales del individuo) y dividir por 100 para obtener la "capacidad de rebrote" (rango de 0 100 sin unidades). Cuando existen datos de más de un sitio, tomar el mayor

valor para la especie, aún cuando esto implique no incluir la variabilidad intraespecífica en la capacidad de rebrote. En estudios a largo plazo, el rebrote puede investigarse experimentalmente mediante el corte de la planta simulando la destrucción del 75-100% de la biomasa aérea (en estos casos las partes cortadas pueden utilizarse para la medición de otros caracteres de interés). Si son encontradas menos de cinco plantas con el daño “apropiado”, dar a la especie por defecto un valor de 50 si se observó al menos algo de rebrote en los individuos encontrados (ver abajo). En especies donde no se observa rebrote simplemente porque no se observa gran destrucción de biomasa es importante considerar estos casos como datos ausentes (no como con valor de rebrote cero).

Casos especiales y extras

- (1) *Datos de la literatura.* En relación a este caracter pueden obtenerse datos muy útiles y legítimos de la literatura o mediante conversaciones con pobladores locales (ej. guardabosques, agricultores, etc.). El investigador debe asegurarse de que en esos casos se hayan cumplido las mismas condiciones de destrucción de biomasa requeridas en el protocolo descrito arriba. Habiendo constatado esto, se debe asignar subjetivamente números para la capacidad de rebrote como: 0, no rebrote; 20, rebrote pobre; 40, rebrote moderado; 60, rebrote sustancial; 80, rebrote abundante y 100, rebrote muy abundante, en función de lo que indique la literatura o las encuestas a pobladores. La misma estimación cruda puede utilizarse para especies en las cuales la estimación cuantitativa no es posible, ej. los individuos que no han rebrotado son difíciles de encontrar luego de un disturbio, tal es el caso de algunas herbáceas.
- (2) *Plantas clonales.* En el caso de las plantas clonales es importante evaluar si los *ramets* pueden rebrotar de las reservas subterráneas y no del follaje de un *ramet* conectado. Por lo tanto, en esas especies, el rebrote solo debería ser considerado si se ha destruido la biomasa aérea de todos los *ramets* vecinos.
- (3) *Rebrote en plantas jóvenes.* El registro adicional de la habilidad de rebrote en plantas jóvenes puede dar importantes pistas acerca de la persistencia de la población, aunque esto pueda también ser visto como un componente del reclutamiento. Así, los datos sobre los límites de edad y tamaño en la habilidad de rebrote pueden revelar importantes pistas de la dinámica de la población. Algunas especies con capacidad para rebrotar no pueden hacerlo antes de cierta edad, y otras pierden dicha capacidad cuando llegan a cierta edad o tamaño.
- (4) *Rebrote luego de una pequeña destrucción de biomasa.* La medición de la capacidad de rebrote luego de la destrucción de una pequeña proporción de biomasa puede dar información importante acerca de la respuesta de las

plantas ante pequeños disturbios. Por ejemplo, se sabe que *Quercus suber* y varias especies de *Eucalyptus spp.* pueden rebrotar de las yemas localizadas en posiciones superiores del tronco, luego de un evento de fuego. Se debe tener en cuenta que especies altamente adaptadas al fuego (como en los casos mencionados) pueden dar una falsa impresión de que un área no ha sido afectada por un fuego recientemente cuando en realidad si lo ha sido. Otras especies de esa área o la observación directa del evento de fuego pueden ser de utilidad en estos casos. La evaluación de la capacidad de rebrote luego de la pérdida de pequeñas cantidades de biomasa también puede ser aplicado a casos en donde han actuado otros pequeños disturbios como herbivoría o destrozos por vertebrados.

Referencias sobre teoría, el significado y bases de datos: Noble and Slatyer (1980); Everham and Brokaw (1996); Pausas (1997); Kammesheidt (1999); Bellingham and Sparrow (2000); Bond and Midgley (2001); Higgins *et al.* (2000); Del Tredici (2001); Burrows (2002); Vesk and Westoby (2004); Pausas and Bradstock (2007); Poorter *et al.* (2010).

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Inter-American Institute for Global Change Research (IAI) CRN 2015 y SGP-CRA 2015, con el apoyo de la US National Science Foundation (Grants GEO-0452325 y GEO-1138881). El trabajo también fue financiado por el FONCyT (PICT 20441 y 365), CONICET (PIP 2006-2011 11220080101532), SECYT-Universidad Nacional de Córdoba - Argentina, y la US NSF (DEB-0620652). Los autores agradecen especialmente a Phil Grime y la UCPE-University of Sheffield, y a Mark Westoby y la ARC-NZ Network Vegetation Function-Macquarie University, por inspirar la discusión y el desarrollo de la medición de caracteres. Los autores también agradecen a Marcelo Cabido, William Bond, Paula Tecco, Fernando Casanoves y Bryan Finegan por sus valiosas discusiones. Los autores agradecen a Diana Abal Solis y Juan Pablo Bellini por la asistencia con las figuras y diagramas; y a Valeria Falczuk por la asistencia técnica en el laboratorio. Los autores agradecen los comentarios de Adrienne Nicotra, Hans Lambers y un revisor anónimo, que ayudaron a mejorar la calidad del manuscrito. Agradecemos a Cristina Ciarlante por su gran ayuda en la edición y formateo de la versión en castellano del manual. Muchos usuarios del manual anterior brindaron información útil sobre las mediciones de caracteres. Finalmente, agradecemos a las plantas de todo el mundo por empezar a develar los secretos de su funcionamiento y sus efectos sobre los ecosistemas.

Referencias

- Ackerly DD (2004) Functional strategies of chaparral shrubs in relation to seasonal water deficit. *Ecological Monographs* **74**, 25–44. doi:10.1890/03-4022
- Ackerly DD, Knight CA, Weiss SB, Barton K, Starmer KP (2002) Leaf size, specific leaf area and microhabitat distribution of chaparral woody plants: contrasting patterns in species level and community level analyses. *Oecologia* **130**, 449–457. doi:10.1007/s004420100805
- Adair EC, Parton WJ, Del Grosso SJ, Silver WL, Harmon ME, Hall SA, Burke IC, Hart SC (2008) Simple three-pool model accurately describes patterns of long-term litter decomposition in diverse climates. *Global Change Biology* **14**, 2636–2660.
- Addington RN, Donovan LA, Mitchell RJ, Vose JM, Pecot SD, Jack SB, Hacke UG, Sperry JS, Oren R (2006) Adjustments in hydraulic architecture of *Pinus palustris* maintain similar stomatal conductance in xeric and mesic habitats. *Plant, Cell & Environment* **29**, 535–545. doi:10.1111/j.1365-3040.2005.01430.x
- Adiku SGK, Rose CW, Braddock RD, Ozier-Lafontaine H (2000) On the simulation of root water extraction: examination of a minimum energy hypothesis. *Soil Science* **165**, 226–236. doi:10.1097/00010694-200003000-00005
- Aerts R (1995) The advantages of being evergreen. *Trends in Ecology & Evolution* **10**, 402–407. doi:10.1016/S0169-5347(00)89156-9
- Aerts R (1996) Nutrient resorption from senescing leaves of perennials are there general patterns? *Journal of Ecology* **84**, 597–608. doi:10.2307/2261481
- Aerts R, Chapin SIII (1999) The mineral nutrition of wild plants revisited: a re-evaluation of processes and patterns. *Advances in Ecological Research* **30**, 1–67. doi:10.1016/S0065-2504(08)60016-1
- Aerts R, Boot RGA, Van der Aart PJM (1991) The relation between above- and belowground biomass allocation patterns and competitive ability. *Oecologia* **87**, 551–559. doi:10.1007/BF00320419
- Agrawal AA, Fishbein M (2006) Plant defense syndromes *Ecology* **87**, S132–S149. doi:10.1890/0012-9658(2006)87[132:PDS]2.0.CO;2
- Albert CH, Thuiller W, Yoccoz NG, Douzet R, Aubert S, Lavorel S (2010) A multi-trait approach reveals the structure and the relative importance of intra- vs. interspecific variability in plant traits. *Functional Ecology* **24**, 1192–1201. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01727.x
- Albert CH, De Bello F, Boulangeat I, Pellet G, Lavorel S, Thuiller W (2012) On the importance of intraspecific variability for the quantification of functional diversity. *Oikos* **121**, 116–126. doi:10.1111/j.1600-0706.2011.19672.x
- Alder NN, Sperry JS, Pockman WT (1996) Root and stem xylem embolism, stomatal conductance, and leaf turgor in *Acer grandidentatum* populations along a soil moisture gradient. *Oecologia* **105**, 293–301. doi:10.1007/BF00328731
- Alder NN, Pockman WT, Nuismer S (1997) Use of centrifugal force in the study of xylem cavitation. *Journal of Experimental Botany* **48**, 665–674. doi:10.1093/jxb/48.3.665
- Allen SE (1989) ‘Chemical analysis of ecological material.’ 2nd edn. (Blackwell: Oxford, UK)
- Anderson JM, Ingram JSI (1993) ‘Tropical soil biology and fertility: a handbook of methods.’ 2nd edn. (CAB International: Wallingford, UK)
- Ansquer P, Duru M, Theau J-P, Cruz P (2009) Convergence in plant traits between species within grassland communities simplifies their monitoring. *Ecological Indicators* **9**, 1020–1029. doi:10.1016/j.ecolind.2008.12.002
- Anten NPR, Schieving F (2010) The role of wood mass density and mechanical constraints in the economy of tree architecture. *American Naturalist* **175**, 250–260. doi:10.1086/649581
- Aranwela N, Sanson G, Read J (1999) Methods of assessing leaf-fracture properties. *New Phytologist* **144**, 369–383. doi:10.1046/j.1469-8137.1999.00506.x
- Archibald S, Bond WJ (2003) Growing tall vs growing wide: tree architecture and allometry of *Acacia* karroo in forest, savanna, and arid environments. *Oikos* **102**, 3–14. doi:10.1034/j.1600-0706.2003.12181.x
- Arneeth A, Harrison SP, Zaehle S, Tsigaridis K, Menon S, Bartlein PJ, Feichter J, Korhola A, Kulmala M, O’Donnell D, Schurgers G, Sorvari S, Vesala T (2010) Terrestrial biogeochemical feedbacks in the climate system. *Nature Geoscience* **3**, 525–532. doi:10.1038/ngeo905
- Ashraf M, Harris PJC (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* **166**, 3–16. doi:10.1016/j.plantsci.2003.10.024
- Aston AR (1979) Rainfall interception by eight small trees. *Journal of Hydrology* **42**, 383–396. doi:10.1016/0022-1694(79)90057-X
- Atkin OK, Bruhn D, Hurry VM, Tjoelker MG (2005) The hot and the cold: unravelling the variable response of plant respiration to temperature. *Functional Plant Biology* **32**, 87–105. doi:10.1071/FP03176
- Austin AT, Vivanco L (2006) Plant litter decomposition in a semi-arid ecosystem controlled by photodegradation. *Nature* **442**, 555–558. doi:10.1038/nature05038
- Bakker JP, Poschod P, Strykstra RJ, Bekker RM, Thompson K (1996) Seed banks and seed dispersal: important topics in restoration ecology. *Acta Botanica Neerlandica* **45**, 461–490.

- Baraloto C, Paine CET, *et al.* (2010a) Decoupled leaf and stem economics in rain forest trees. *Ecology Letters* **13**, 1338–1347. doi:10.1111/j.1461-0248.2010.01517.x
- Baraloto C, Paine CET, Patiño S, Bonal D, Hérault B, Chave J (2010b) Functional trait variation and sampling strategies in species-rich plant communities. *Functional Ecology* **24**, 208–216. doi:10.1111/j.1365-2435.2009.01600.x
- Barkman J (1988) New systems of plant growth forms and phenological plant types. In 'Plant form and vegetation structure'. (Eds MJA Werger, PJM Van der Aart, HJ During, JTA Verhoeven) pp. 9–44. (SPB Academic Publishers: The Hague, The Netherlands)
- Bartlett M, Scoffoni C, Sack L (2012) The determinants of leaf turgor loss point and prediction of drought tolerance of species and biomes: a global meta-analysis. *Ecology Letters* **15**, 393–405. doi:10.1111/j.1461-0248.2012.01751.x
- Belea A, Kiss AS, Galbaics Z (1998) New methods for determination of C-3, C-4 and CAM-type plants. *Cereal Research Communications* **26**, 413–418.
- Bellingham PJ, Sparrow AD (2000) Resprouting as a life history strategy in woody plant communities. *Oikos* **89**, 409–416. doi:10.1034/j.1600-0706.2000.890224.x
- Berg B, Laskowski R (2005) Litter decomposition: a guide to carbon and nutrient turnover. *Advances in Ecological Research* **38**, 1–428. doi:10.1016/S0065-2504(05)38001-9
- Bhaskar R, Ackerly DD (2006) Ecological relevance of minimum seasonal water potentials. *Physiologia Plantarum* **127**, 353–359. doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00718.x
- Blonder B, Buzzard V, *et al.* (2012) The leaf area shrinkage effect can bias paleoclimate and ecology research. *American Journal of Botany* **99**, 1756–1763. doi:10.3732/ajb.1200062
- Blum A (1988) 'Plant breeding for stress environments.' (CRC Press: Boca Raton, FL)
- Böhm W (1979) 'Methods of studying root systems. Ecological studies 33.' (Springer: Berlin)
- Bond WJ, Midgley JJ (1995) Kill thy neighbour: an individualistic argument for the evolution of flammability. *Oikos* **73**, 79–85. doi:10.2307/3545728
- Bond WJ, Midgley JJ (2001) Ecology of sprouting in woody plants: the persistence niche. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 45–51. doi:10.1016/S0169-5347(00)02033-4
- Bond WJ, Van Wilgen BW (1996) 'Fire and plants.' (Chapman and Hall: London)
- Bouma TJ, Nielsen KL, Koutstaal B (2000) Sample preparation and scanning protocol for computerised analysis of root length and diameter. *Plant and Soil* **218**, 185–196. doi:10.1023/A:1014905104017
- Box EO (1996) Plant functional types and climate at the global scale. *Journal of Vegetation Science* **7**, 309–320. doi:10.2307/3236274
- Boyce CK, Brodribb TJ, Feild TS, Zwieniecki MA (2009) Angiosperm leaf vein evolution was physiologically and environmentally transformative. *Proceedings. Biological Sciences* **276**, 1771–1776. doi:10.1098/rspb.2008.1919
- Brando PM, Nepstad DC, Balch JK, Bolker B, Christman MC, Coe M, Putz FE (2012) Fire-induced tree mortality in a neotropical forest: the roles of bark traits, tree size, wood density and fire behavior. *Global Change Biology* **18**, 630–641. doi:10.1111/j.1365-2486.2011.02533.x
- Breckle SW (2002) Salinity, halophytes and salt affected natural ecosystems. In 'Salinity: environment–plants–molecules'. (Eds A Läuchli, U Lüttge) pp. 53–77. (Kluwer Academic Publishers: London)
- Brewer CA, Núñez CI (2007) Patterns of leaf wettability along extreme moisture gradient in western Patagonia, Argentina. *International Journal of Plant Sciences* **168**, 555–562. doi:10.1086/513468
- Brewer CA, Smith WK, Vogelmann TC (1991) Functional interaction between leaf trichomes, leaf wettability and the optical properties of water droplets. *Plant, Cell & Environment* **14**, 955–962. doi:10.1111/j.1365-3040.1991.tb00965.x
- Brodribb TJ, Feild TS (2010) Leaf hydraulic evolution led a surge in leaf photosynthetic capacity during early angiosperm diversification. *Ecology Letters* **13**, 175–183. doi:10.1111/j.1461-0248.2009.01410.x
- Brodribb TJ, Hill RS (2000) Increases in water potential gradient reduce xylem conductivity in whole plants. Evidence from a low-pressure conductivity method. *Plant Physiology* **123**, 1021–1028. doi:10.1104/pp.123.3.1021
- Brodribb TJ, Holbrook NM, Edwards EJ, Gutiérrez MV (2003) Relations between stomatal closure, leaf turgor and xylem vulnerability in eight tropical dry forest trees. *Plant, Cell & Environment* **26**, 443–450. doi:10.1046/j.1365-3040.2003.00975.x
- Brodribb TJ, Feild TS, Jordan GJ (2007) Leaf maximum photosynthetic rate and venation are linked by hydraulics. *Plant Physiology* **144**, 1890–1898. doi:10.1104/pp.107.101352
- Brodribb TJ, Feild TS, Sack L (2010) Viewing leaf structure and evolution from a hydraulic perspective. *Functional Plant Biology* **37**, 488–498. doi:10.1071/FP10010
- Brown S (1997) 'Estimating biomass and biomass change of tropical forests. A primer.' FAO Forestry Paper 134. (FAO: Rome)
- Brussaard L, Caron P, Campbell B, Lipper L, Mainka S, Rabbinge R, Babin D, Pulleman M (2010) Reconciling biodiversity conservation and food security: scientific challenges for a new agriculture. *Current Opinion in Environmental Sustainability* **2**, 34–42. doi:10.1016/j.cosust.2010.03.007
- Bruun HH, Poschlod P (2006) Why are small seeds dispersed through animal guts: large numbers or seed size *per se*? *Oikos* **113**, 402–411. doi:10.1111/j.2006.0030-1299.14114.x

- Bucci SJ, Goldstein G, Meinzer FC, Scholz FG, Franco AC, Bustamante M (2004) Functional convergence in hydraulic architecture and water relations of tropical savanna trees: from leaf to whole plant. *Tree Physiology* **24**, 891–899. doi:10.1093/treephys/24.8.891
- Buckley TN, Roberts DW (2006) How should leaf area, sapwood area and stomatal conductance vary with tree height to maximize growth? *Tree Physiology* **26**, 145–157. doi:10.1093/treephys/26.2.145
- Burd M (2007) Adaptive function of drip tips: a test of the epiphyll hypothesis in *Psychotria marginata* and *Faramaea occidentalis* (Rubiaceae). *Journal of Tropical Ecology* **23**, 449–455. doi:10.1017/S0266467407004166
- Burrows GE (2002) Epicormic strand structure in *Angophora*, *Eucalyptus* and *Lophostemon* (Myrtaceae)—implications for fire resistance and recovery. *New Phytologist* **153**, 111–131. doi:10.1046/j.0028-646X.2001.00299.x
- Cadisch G, Giller KE (1997) ‘Driven by Nature. Plant litter quality and decomposition.’ (CAB International: London)
- Cain SA (1950) Life-forms and phytoclimate. *Botanical Review* **16**, 1–32. doi:10.1007/BF02879783
- Caldwell MM, Virginia RA (1989) Root systems. In ‘Plant physiological ecology: field methods and instrumentation’. (Ed. RW Pearcy) pp. 367–398. (Chapman and Hall: London)
- Cardinale BJ, Duffy JE, *et al.* (2012) Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature* **486**, 59–67. doi:10.1038/nature11148
- Casanoves F, Pla L, Di Rienzo JA, Díaz S (2011) FDiversity: a software package for the integrated analysis of functional diversity. *Methods in Ecology and Evolution* **2**, 233–237. doi:10.1111/j.2041-210X.2010.00082.x
- Castro-Díez P, Puyravaud JP, Cornelissen JHC (2000) Leaf structure and anatomy as related to leaf mass per area variation in seedlings of a wide range of woody plant species and types. *Oecologia* **124**, 476–486. doi:10.1007/PL00008873
- Causton DR, Venus JC (1981) ‘The biometry of plant growth.’ (Edward Arnold: London)
- Cavender-Bares J, Kitajima K, Bazzaz FA (2004) Multiple trait associations in relation to habitat differentiation among 17 floridian oak species. *Ecological Monographs* **74**, 635–662. doi:10.1890/03-4007
- Cavender-Bares J, Kozak KH, Fine PVA, Kembel SW (2009) The merging of community ecology and phylogenetic biology. *Ecology Letters* **12**, 693–715. doi:10.1111/j.1461-0248.2009.01314.x
- Cernusak LA, Tcherkez G, Keitel C, Cornwell WK, Santiago LS, Knohl A, Barbour MM, Williams DG, Reich PB, Ellsworth DS, Dawson TE, Griffiths HG, Farquhar GD, Wright IJ (2009) Why are non-photosynthetic tissues generally ¹³C enriched compared with leaves in C₃ plants? Review and synthesis of current hypotheses. *Functional Plant Biology* **36**, 199–213. doi:10.1071/FP08216
- Chabot BF, Hicks DJ (1982) The ecology of leaf life span. *Annual Review of Ecology and Systematics* **13**, 229–259. doi:10.1146/annurev.es.13.110182.001305
- Chapin FS, III (1980) The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **11**, 233–260. doi:10.1146/annurev.es.11.110180.001313
- Chapin FS, III, Autumn K, Pugnaire F (1993) Evolution of suites of traits in response to environmental stress. *American Naturalist* **142**, S78–S92. doi:10.1086/285524
- Chapin FS, III, Zaveleta ES, Eviner VT, Naylor RL, Vitousek PM, Lavorel S, Reynolds HL, Hooper DU, Sala OE, Hobbie SE, Mack MC, Diaz S (2000) Consequences of changing biotic diversity. *Nature* **405**, 234–242. doi:10.1038/35012241
- Chapin FS, III, Trainor SF, *et al.* (2008) Increasing wildfire in Alaska’s boreal forest: pathways to potential solutions of a wicked problem. *Bioscience* **58**, 531–540. doi:10.1641/B580609
- Chave J, Andalo C, *et al.* (2005) Tree allometry and improved estimation of carbon stocks and balance in tropical forests. *Oecologia* **145**, 87–99. doi:10.1007/s00442-005-0100-x
- Chave J, Coomes DA, Jansen S, Lewis SL, Swenson NG, Zanne AE (2009) Towards a worldwide wood economics spectrum. *Ecology Letters* **12**, 351–366. doi:10.1111/j.1461-0248.2009.01285.x
- Chen N, Black TA (1992) Defining leaf area index for non-flat leaves. *Plant, Cell & Environment* **15**, 421–429. doi:10.1111/j.1365-3040.1992.tb00992.x
- Cherubini P, Gartner BL, Tognetti R, Bräker OU, Schoch W, Innes JL (2003) Identification, measurement and interpretation of tree rings in woody species from mediterranean climates. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **78**, 119–148. doi:10.1017/S1464793102006000
- Chiba Y (1991) Plant form based on the pipe model theory II. Quantitative analysis of ramification in morphology. *Ecological Research* **6**, 21–28. doi:10.1007/BF02353867
- Choat B, Sack L, Holbrook NM (2007) Diversity of hydraulic traits in nine *Cordia* species growing in tropical forests with contrasting precipitation. *New Phytologist* **175**, 686–698. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02137.x
- Choong MF, Lucas PW, Ong JSY, Pereira B, Tan HTW, Turner IM (1992) Leaf fracture toughness and sclerophylly: their correlations and ecological implications. *New Phytologist* **121**, 597–610. doi:10.1111/j.1469-8137.1992.tb01131.x
- Clements ES (1905) The relation of leaf structure to physical factors. *Transactions of the American Microscopical Society* **26**, 19–102. doi:10.2307/3220956
- Cochard H, Cruizat P, Tyree MT (1992) Use of positive pressures to establish vulnerability curves. *Plant Physiology* **100**, 205–209. doi:10.1104/pp.100.1.205

- Coley PD (1987) Patronos en las defensas de las plantas: ¿por qué los herbívoros prefieren ciertas especies? *Revista de Biología Tropical* **35**, 151–164.
- Coley PD (1988) Effects of plant growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore defense. *Oecologia* **74**, 531–536. doi:10.1007/BF00380050
- Cooper SM, Ginnett TF (1998) Spines protect plants against browsing by small climbing mammals. *Oecologia* **113**, 219–221. doi:10.1007/s004420050371
- Cooper DJ, D'Amico DR, Scott ML (2003) Physiological and morphological response patterns of *Populus deltoides* to alluvial groundwater pumping. *Environmental Management* **31**, 215–226. doi:10.1007/s00267-002-2808-2
- Cornelissen JHC (1996) An experimental comparison of leaf decomposition rates in a wide range of temperate plant species and types. *Journal of Ecology* **84**, 573–582. doi:10.2307/2261479
- Cornelissen JHC (1999) A triangular relationship between leaf size and seed size among woody species: allometry, ontogeny, ecology and taxonomy. *Oecologia* **118**, 248–255. doi:10.1007/s004420050725
- Cornelissen JHC, Castro-Díez P, Hunt R (1996) Seedling growth, allocation and leaf attributes in a wide range of woody plant species and types. *Journal of Ecology* **84**, 755–765. doi:10.2307/2261337
- Cornelissen JHC, Werger MJA, Castro-Díez P, Van Rheenen JWA, Rowland AP (1997) Foliar nutrients in relation to growth, allocation and leaf traits in seedlings of a wide range of woody plant species and types. *Oecologia* **111**, 460–469. doi:10.1007/s004420050259
- Cornelissen JHC, Pérez-Harguindeguy N, Díaz S, Grime JP, Marzano B, Cabido M, Vendramini F, Cerabolini B (1999) Leaf structure and defence control litter decomposition rate across species and life forms in regional floras on two continents. *New Phytologist* **143**, 191–200. doi:10.1046/j.1469-8137.1999.00430.x
- Cornelissen JHC, Lavorel S, et al. (2003) A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* **51**, 335–380. doi:10.1071/BT02124
- Cornelissen JHC, Quested H, Van Logtestijn RSP, Pérez-Harguindeguy N, Gwynn-Jones D, Díaz S, Callaghan TV, Press MC, Aerts R (2006) Foliar pH as a new plant trait: can it explain variation in foliar chemistry and carbon cycling processes among Subarctic plant species and types? *Oecologia* **147**, 315–326. doi:10.1007/s00442-005-0269-z
- Cornelissen JHC, Van Bodegom PM, et al. (2007) Global negative vegetation feedback to climate warming responses of leaf litter decomposition rates in cold biomes. *Ecology Letters* **10**, 619–627. doi:10.1111/j.1461-0248.2007.01051.x
- Cornelissen JHC, Sibma F, Van Logtestijn RSP, Broekman R, Thompson K (2011) Leaf pH as a plant trait: species-driven rather than soil-driven variation. *Functional Ecology* **25**, 449–455. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01765.x
- Cornwell WK, Bhaskar R, Sack L, Cordell S, Lurch CK (2007) Adjustment of structure and function of Hawaiian *Metrosideros polymorpha* at high vs. low precipitation. *Functional Ecology* **21**, 1063–1071. doi:10.1111/j.1365-2435.2007.01323.x
- Cornwell WK, Cornelissen JHC, et al. (2008) Plant species traits are the predominant control on litter decomposition rates within biomes worldwide. *Ecology Letters* **11**, 1065–1071. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01219.x
- Cornwell WK, Cornelissen JHC, et al. (2009) Plant traits and wood fates across the globe: rotted, burned, or consumed? *Global Change Biology* **15**, 2431–2449. doi:10.1111/j.1365-2486.2009.01916.x
- Cousens RD, Hill J, French K, Bishop I D (2010) Towards better prediction of seed dispersal by animals: conceptual frameworks and process-based models. *Functional Ecology* **24**, 1163–1170. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01747.x
- Craine JM (2009) 'Resource strategies of wild plants.' (Princeton University Press: Princeton, NJ)
- Craine JM, Berin DM, Reich PB, Tilman D, Knops J (1999) Measurement of leaf longevity of 14 species of grasses and forbs using a novel approach. *New Phytologist* **142**, 475–481. doi:10.1046/j.1469-8137.1999.00411.x
- Craine JM, Tilman DG, Wedin DA, Chapin S, III (2001) The relationships among root and leaf traits of 76 grassland species and relative abundance along fertility and disturbance gradients. *Oikos* **93**, 274–285. doi:10.1034/j.1600-0706.2001.930210.x
- Cramer W (1997) Using plant functional types in a global vegetation model. In 'Plant functional types'. (Eds TM Smith, HH. Shugart, FI Woodward) pp. 271–288. (Cambridge University Press: Cambridge, UK)
- Cramer W, Bondeau A, et al. (2001) Global response of terrestrial ecosystem structure and function to CO₂ and climate change: results from six dynamic global vegetation models. *Global Change Biology* **7**, 357–373. doi:10.1046/j.1365-2486.2001.00383.x
- Darvell BW, Lee PKD, Yuen TDB, Lucas PW (1996) A portable fracture toughness tester for biological materials. *Measurement Science & Technology* **7**, 954–962. doi:10.1088/0957-0233/7/6/016
- David JS, Valente F, Gash JHC (2005) Evaporation of intercepted rainfall. In 'Encyclopedia of hydrological sciences'. (Ed. MG Anderson) pp. 627–634. (John Wiley and Sons: Chichester, UK)
- Davis SD, Ewers FW, Sperry JS, Portwood KA, Crocker MC, Adams GC (2002) Shoot dieback during prolonged drought in *Ceanothus* (Rhamnaceae) chaparral of

- California: a possible case of hydraulic failure. *American Journal of Botany* **89**, 820–828. doi:10.3732/ajb.89.5.820
- De Bello F, Lavorel S, Gerhold P, Reier Ü, Pärtel M (2010a) A biodiversity monitoring framework for practical conservation of grasslands and shrublands. *Biological Conservation* **143**, 9–17. doi:10.1016/j.biocon.2009.04.022
- De Bello F, Lavorel S, Albert CH, Thuiller W, Grigulis K, Dolezal J, Janecek S, Lêps J (2011) Quantifying the relevance of intraspecific trait variability for functional diversity. *Methods in Ecology and Evolution* **2**, 163–174. doi:10.1111/j.2041-210X.2010.00071.x
- De Kroon H, Van Groenendael JM (1997) 'The ecology and evolution of clonal plants.' (Backhuys Publishers: Leiden, The Netherlands)
- De Vogel EF (1980) 'Seedlings of dicotyledons.' (Centre for Agricultural Publishing and Documentation: Wageningen, The Netherlands)
- De Witte LC, Stöcklin J (2010) Longevity of clonal plants: why it matters and how to measure it. *Annals of Botany* **106**, 859–870. doi:10.1093/aob/mcq191
- Del Tredici P (2001) Sprouting in temperate trees: a morphological and ecological review. *Botanical Review* **67**, 121–140. doi:10.1007/BF02858075
- Díaz S, Hodgson JG, *et al.* (2004) The plant traits that drive ecosystems: evidence from three continents. *Journal of Vegetation Science* **15**, 295–304.
- Díaz S, Lavorel S, De Bello F, Quétier F, Grigulis K, Robson MT (2007) Incorporating plant functional diversity effects in ecosystem service assessments. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **104**, 20684–20689. doi:10.1073/pnas.0704716104
- Diefendorf AF, Mueller KE, Wing SL, Koch PL, Freeman KH (2010) Global patterns in leaf ¹³C discrimination and implications for studies of past and future climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **107**, 5738–5743. doi:10.1073/pnas.0910513107
- Diemer M (1998) Life span and dynamics of leaves of herbaceous perennials in high-elevation environments: 'news from the elephant's leg'. *Functional Ecology* **12**, 413–425. doi:10.1046/j.1365-2435.1998.00207.x
- Dilcher DL (1974) Approaches to the identification of angiosperm leaf remains. *Botanical Review* **40**, 1–157. doi:10.1007/BF02860067
- Dimitrakopoulos AP, Panov PI (2001) Pyric properties of some dominant Mediterranean vegetation species. *International Journal of Wildland Fire* **10**, 23–27. doi:10.1071/WF01003
- Doherty RM, Sitch S, Smith B, Lewis SL, Thornton PK (2010) Implications of future climate and atmospheric CO₂ content for regional biogeochemistry, biogeography and ecosystem services across East Africa. *Global Change Biology* **16**, 617–640. doi:10.1111/j.1365-2436.2009.01997.x
- Domingo F, Sánchez G, Moro MJ, Brenner AJ, Puigdefábregas J (1998) Measurement and modelling of rainfall interception by three semi-arid canopies. *Agricultural and Forest Meteorology* **91**, 275–292. doi:10.1016/S0168-1923(98)00068-9
- Dunbabin V, Rengel Z, Diggie AJ (2004) Simulating form and function of root systems: efficiency of nitrate uptake is dependent on root system architecture and the spatial and temporal variability of nitrate supply. *Functional Ecology* **18**, 204–211. doi:10.1111/j.0269-8463.2004.00827.x
- Eamus D, Prior L (2001) Ecophysiology of trees of seasonally dry tropics: comparisons among phenologies. *Advances in Ecological Research* **32**, 113–197. doi:10.1016/S0065-2504(01)32012-3
- Earnshaw MJ, Carver KA, Gunn TC, Kerenga K, Harvey V, Griffiths H, Broadmeadow MSJ (1990) Photosynthetic pathway, chilling tolerance and cell sap osmotic potential values of grasses along an altitudinal gradient in Papua New Guinea. *Oecologia* **84**, 280–288.
- Edwards EJ, Still CJ, Donoghue MJ (2007) The relevance of phylogeny to studies of global change. *Trends in Ecology & Evolution* **22**, 243–249. doi:10.1016/j.tree.2007.02.002
- Ehleringer JR (1991) ¹³C/¹²C fractionation and its utility in terrestrial plant studies. In 'Carbon isotopes techniques'. (Eds DC Coleman, B Fry) pp. 187–200. (Academic Press: London)
- Ehleringer JR, Osmond CB (2000) Stable isotopes. In 'Plant physiological ecology: field methods and instrumentation'. (Eds RW Pearcy, J Ehleringer, HA Mooney, PW Rundel) pp. 281–300. (Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands)
- Ehleringer JR, Cerling TE, Helliker BR (1997) C₄ photosynthesis, atmospheric CO₂, and climate. *Oecologia* **112**, 285–299. doi:10.1007/s004420050311
- Eissenstat DM, Yanai RD (1997) The ecology of root lifespan. *Advances in Ecological Research* **27**, 1–60. doi:10.1016/S0065-2504(08)60005-7
- Elberse WTH, Berendse F (1993) A comparative study of the growth and morphology of eight grass species from habitats with different nutrient availabilities. *Functional Ecology* **7**, 223–229. doi:10.2307/2389891
- Eliáš P (1985) Leaf indices of woodland herbs as indicators of habitat conditions. *Ekologia* **4**, 289–295.
- Ellenberg H, Müller-Dombois D (1967) A key to Raunkiaer plant life forms with revised subdivisions. *Berichte des geobotanischen Institutes der ETH. Stiftung Rübel* **37**, 56–73.
- Ellsworth DS, Reich PB (1992) Water relations and gas exchange of *Acer saccharum* seedlings in contrasting natural light and water regimes. *Tree Physiology* **10**, 1–20. doi:10.1093/treephys/10.1.1
- Enquist BJ (2002) Universal scaling in tree and vascular plant allometry: toward a general quantitative theory linking

- plant form and function from cells to ecosystems. *Tree Physiology* **22**, 1045–1064. doi:10.1093/treephys/22.15-16.1045
- Enríquez S, Duarte CM, Sand-Jensen K, Nielsen SL (1996) Broad-scale comparison of photosynthetic rates across phototrophic organisms. *Oecologia* **108**, 197–206.
- Etlinger MG, Beall FC (2004) Development of a laboratory protocol for fire performance of landscape plants. *International Journal of Wildland Fire* **13**, 479–488. doi:10.1071/WF04039
- Evans GC (1972) 'The quantitative analysis of plant growth.' (Blackwell Scientific Publications: Oxford, UK)
- Everham EM, Brokaw NVL (1996) Forest damage and recovery from catastrophic wind. *Botanical Review* **62**, 113–185. doi:10.1007/BF02857920
- Ewel JJ, Bigelow SW (1996) Plant life forms and ecosystem functioning. In 'Biodiversity and ecosystem processes in tropical forests'. (Eds GH Orians, R Dirzo, JH Cushman) pp. 101–126. (Springer: Berlin)
- Faith DP, Magallón S, Hendry AP, Conti E, Yahara T, Donoghue MJ (2010) Ecosystem services: an evolutionary perspective on the links between biodiversity and human well-being. *Current Opinion in Environmental Sustainability* **2**, 66–74. doi:10.1016/j.cosust.2010.04.002
- FAO (1999) 'Soil salinity assessment. Methods and interpretation of electrical conductivity measurements.' FAO irrigation and drainage paper 57. (FAO: Rome)
- Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 503–537. doi:10.1146/annurev.pp.40.060189.002443
- Feild TS, Balun L (2008) Xylem hydraulic and photosynthetic function of *Gnetum* (Gnetales) species from Papua New Guinea. *New Phytologist* **177**, 665–675. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02306.x
- Field C, Mooney HA (1986) The photosynthesis–nitrogen relationship in wild plants. In 'On the economy of plant form and function'. (Ed. TJ Givnish) pp. 25–55. (Cambridge University Press: Cambridge, UK)
- Finzi AC, Van Breemen N, Canham CD (1998) Canopy tree-soil interactions within temperate forests: species effects on soil carbon and nitrogen. *Ecological Applications* **8**, 440–446.
- Fischer M, Stöcklin J (1997) Local extinctions of plants in remnants of extensively used calcareous grasslands 1950–85. *Conservation Biology* **11**, 727–737. doi:10.1046/j.1523-1739.1997.96082.x
- Fischer S, Poschod P, Beinlich B (1996) Experimental studies on the dispersal of plants and animals on sheep in calcareous grasslands. *Journal of Applied Ecology* **33**, 1206–1221. doi:10.2307/2404699
- Fisher JB (1986) Branching patterns and angles in trees. In 'On the economy of plant form and function'. (Ed. TJ Givnish) pp. 493–523. (Cambridge University Press: Cambridge, UK)
- Fitter A (1996) Characteristics and functions of root systems. In 'Plant roots: the hidden half'. 2nd edn. (Eds Y Waisel, A Eshel, U Kafkafi) pp. 1–20. (Marcel Dekker: New York)
- Flowers TJ, Colmer TD (2008) Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* **179**, 945–963. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02531.x
- Flowers TJ, Troke PF, Yeo AR (1977) The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* **28**, 89–121. doi:10.1146/annurev.pp.28.060177.000513
- Flowers TJ, Hajibagheri MA, Clipson NJW (1986) Halophytes. *The Quarterly Review of Biology* **61**, 313–337. doi:10.1086/415032
- Forget P, Wenny D (2005) How to elucidate seed fate? A review of methods used to study seed removal and secondary seed dispersal. In 'Seed fate: predation, dispersal and seedling establishment'. (Eds P Forget, J Lambert, P Hulme, S Vander Wal) pp. 379–394. (CABI Publishing: Wallingford, UK)
- Fortunel C, Garnier E, *et al.* (2009) Leaf traits capture the effects of land use changes and climate on litter decomposability of grasslands across Europe. *Ecology* **90**, 598–611. doi:10.1890/08-0418.1
- Fortunel C, Fine PVA, Baraloto C (2012) Leaf, stem and root tissue strategies across 758 Neotropical tree species. *Functional Ecology* **26**, 1153–1161. doi:10.1111/j.1365-2435.2012.02020.x
- Freschet GT, Cornelissen JHC, Van Logtestijn RSP, Aerts R (2010) Evidence of the 'plant economics spectrum' in a Subarctic flora. *Journal of Ecology* **98**, 362–373. doi:10.1111/j.1365-2745.2009.01615.x
- Freschet GT, Aerts R, Cornelissen JHC (2012) A plant economics spectrum of litter decomposability. *Functional Ecology* **26**, 56–65. doi:10.1111/j.1365-2435.2011.01913.x
- Funes G, Basconcelo S, Díaz S, Cabido M (1999) Seed bank dynamics of *Lachemilla pinnata* (Rosaceae) in different plant communities of mountain grassland in central Argentina. *Annales Botanici Fennici* **36**, 109–114.
- Gardner RO (1975) Overview of botanical clearing technique. *Stain Technology* **50**, 99–105.
- Garnier E, Laurent G (1994) Leaf anatomy, specific mass and water content in congeneric annual and perennial grass species. *New Phytologist* **128**, 725–736. doi:10.1111/j.1469-8137.1994.tb04036.x
- Garnier E, Navas M-L (2012) A trait-based approach to comparative functional plant ecology: concepts, methods and applications for agroecology. *Agronomy for Sustainable Development* **32**, 365–399. doi:10.1007/s13593-011-0036-y
- Garnier E, Shipley B, Roumet C, Laurent G (2001a) A standardized protocol for the determination of specific leaf area and leaf dry matter content. *Functional Ecology* **15**, 688–695. doi:10.1046/j.0269-8463.2001.00563.x
- Garnier E, Laurent G, Debain S, Berthelie P, Ducout B, Roumet C, Navas M-L (2001b) Consistency of species

- ranking based on functional leaf traits. *New Phytologist* **152**, 69–83. doi:10.1046/j.0028-646x.2001.00239.x
- Garnier E, Cortez J, *et al.* (2004) Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. *Ecology* **85**, 2630–2637. doi:10.1890/03-0799
- Garnier E, Lavorel S, *et al.* (2007) Assessing the effects of land-use change on plant traits, communities and ecosystem functioning in grasslands: a standardized methodology and lessons from an application to 11 European sites. *Annals of Botany* **99**, 967–985. doi:10.1093/aob/mcl215
- Gartner BL (1995) 'Plant stems: physiology and functional morphology.' (Academic Press: San Diego, CA)
- Gartner BL, Moore JC, Gardiner BA (2004) Gas in stems: abundance and potential consequences for tree biomechanics. *Tree Physiology* **24**, 1239–1250. doi:10.1093/treephys/24.11.1239
- Garwood NC (1996) Functional morphology of tropical tree seedlings. In 'The ecology of tropical forest tree seedlings'. (Ed. MD Swaine) pp. 59–129. (Parthenon: New York)
- Gatsuk LE, Smirnova OV, Vorontzova LI, Zaugolnova LB, Zhukova LA (1980) Age states of plants of various growth forms: a review. *Journal of Ecology* **68**, 675–696. doi:10.2307/2259429
- Gaucherand S, Lavorel S (2007) New method for rapid assessment of the functional composition of herbaceous plant communities. *Austral Ecology* **32**, 927–936. doi:10.1111/j.1442-9993.2007.01781.x
- Gaudet CL, Keddy PA (1988) A comparative approach to predicting competitive ability from plant traits. *Nature* **334**, 242–243. doi:10.1038/334242a0
- Gill AM, Zylstra P (2005) Flammability of Australian forests. *Australian Forestry* **68**, 88–94.
- Givnish TJ (1979) On the adaptive significance of leaf form. In 'Topics in plant population biology'. (Ed. OT Solbrig, S Jain, GB Johnson, PH Raven) pp. 375–407. (Macmillan: London)
- Givnish TJ (1987) Comparative studies of leaf form: assessing the relative roles of selective pressures and phylogenetic constraints. *New Phytologist* **106**, 131–160. doi:10.1111/j.1469-8137.1987.tb04687.x
- Gowda JH, Palo RT (2003) Age-related changes in defensive traits of *Acacia tortilis* Hayne. *African Journal of Ecology* **41**, 218–223. doi:10.1046/j.1365-2028.2003.00434.x
- Gowda J, Raffaele E (2004) Spine production is induced by fire: a natural experiment with three *Berberis* species. *Acta Oecologica* **26**, 239–245. doi:10.1016/j.actao.2004.08.001
- Graça MAS, Bärlocher F, Gessner MO (2005) 'Methods to study litter decomposition.' (Springer: Dordrecht, The Netherlands)
- Green DS, Kruger EL (2001) Light-mediated constraints on leaf function correlate with leaf structure among deciduous and evergreen tree species. *Tree Physiology* **21**, 1341–1346. doi:10.1093/treephys/21.18.1341
- Grime JP (1979) Competition and the struggle for existence. In 'Population dynamics'. (Eds RM Anderson, BD Turner, LR Taylor) pp. 123–139. (Blackwell Scientific Publications: Oxford, UK)
- Grime JP, Hunt R (1975) Relative growth-rate: its range and adaptive significance in a local flora. *Journal of Ecology* **63**, 393–422. doi:10.2307/2258728
- Grime JP, Blythe GM, Thornton JD (1970) Food selection by the snail *Cepaea nemoralis* L. In 'Animal populations in relation to their food resources'. (Ed. A Watson) pp. 73–99. (Blackwell Scientific Publications: Oxford, UK)
- Grime JP, Cornelissen JHC, Thompson K, Hodgson JG (1996) Evidence of a causal connection between anti-herbivore defense and the decomposition rate of leaves. *Oikos* **77**, 489–494. doi:10.2307/3545938
- Grime JP, Thompson K, *et al.* (1997) Integrated screening validates primary axes of specialisation in plants. *Oikos* **79**, 259–281. doi:10.2307/3546011
- Grubb PJ (1992) A positive distrust in simplicity – lessons from plant defences and from competition among plants and among animal. *Journal of Ecology* **80**, 585–610. doi:10.2307/2260852
- Gubsch M, Buchmann N, Schmid B, Schulze ED, Lipowsky A, Roscher C (2011) Differential effects of plant diversity on functional trait variation of grass species. *Annals of Botany* **107**, 157–169. doi:10.1093/aob/mcq220
- Gurvich DE, Díaz S, Falczuk V, Pérez-Harguindeguy N, Cabido M, Thorpe C (2002) Foliar resistance to simulated extreme temperature events in contrasting plant functional and chorological types. *Global Change Biology* **8**, 1139–1145. doi:10.1046/j.1365-2486.2002.00540.x
- Hanley ME, Lamont BB (2002) Relationships between physical and chemical attributes of congeneric seedlings: how important is seedling defence? *Functional Ecology* **16**, 216–222. doi:10.1046/j.1365-2435.2002.00612.x
- Harrison SP, Marlon JR, Bartlein PJ (2010) Fire in the Earth system. In 'Changing climates, earth systems and society'. (Ed. J Dodson) pp. 21–48. (Springer: Dordrecht, The Netherlands)
- Hartley SE, Jones CG (1997) Plant chemistry and herbivory, or why the world is green. In 'Plant ecology'. (Ed. MJ Crawley) pp. 284–324. (Blackwell Science: Oxford, UK)
- Hattersley PW, Watson L (1992) Diversification of photosynthesis. In 'Grass evolution and domestication'. (Ed. GP Chapman) pp. 38–116. (Cambridge University Press: London)
- Hendry GAF, Grime JP (1993) 'Methods in comparative plant ecology. A laboratory manual.' (Chapman and Hall: London)
- Herwitz SR (1985) Interception storage capacities of tropical rainforest canopy trees. *Journal of Hydrology* **77**, 237–252. doi:10.1016/0022-1694(85)90209-4
- Hibberd JM, Quick WP (2002) Characteristics of C₄ photosynthesis in stems and petioles of C₃ flowering plants. *Nature* **415**, 451–454. doi:10.1038/415451a

- Higgins SI, Bond WJ, Trollope WSW (2000) Fire, resprouting and variability: a recipe for grass-tree coexistence in savanna. *Journal of Ecology* **88**, 213–229. doi:10.1046/j.1365-2745.2000.00435.x
- Hinckley TM, Lassoie JP, Running SW (1978) Temporal and spatial variations in the water status of forest trees. *Forest Science* **20**, a0001–z0001.
- Hirose T, Werger MJA (1995) Canopy structure and photon flux partitioning among species in a herbaceous plant community. *Ecology* **76**, 466–474. doi:10.2307/1941205
- Hladik A, Miquel S (1990) Seedling types and plant establishment in an African rain forest. In 'Reproductive ecology of tropical plants'. (Eds KS Bawa, M Hadley) pp. 261–282. (UNESCO/Parthenon: Carnforth, UK).
- Hodge A (2004) The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist* **162**, 9–24. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01015.x
- Hodgson JG, Wilson PJ, Hunt R, Grime JP, Thompson K (1999) Allocating C-S-R plant functional types: a soft approach to a hard problem. *Oikos* **85**, 282–294. doi:10.2307/3546494
- Hodgson JG, Montserrat-Martí G, et al. (2011) Is leaf dry matter content a better predictor of soil fertility than specific leaf area? *Annals of Botany* **108**, 1337–1345. doi:10.1093/aob/mcr225
- Holbrook NM, Zwieniecki MA (2005) 'Vascular transport in plants.' (Elsevier Academic Press: London)
- Horn HS (1971) 'The adaptive geometry of trees.' (Princeton University Press: Princeton, NJ)
- Horneck DA, Miller RO (1998) Determination of total nitrogen in plant tissue. In 'Handbook and reference methods for plant analysis'. (Ed. YP Kalra) pp. 75–84. (CRC Press: New York)
- Howe HF, Smallwood J (1982) Ecology of seed dispersal. *Annual Review of Ecology and Systematics* **13**, 201–228. doi:10.1146/annurev.es.13.110182.001221
- Howe HF, Westley LC (1997) Ecology of pollination and seed dispersal. In 'Plant ecology'. (Ed. MJ Crawley) pp. 262–283. (Blackwell: Oxford, UK)
- Hulme PE (1998) Post-dispersal seed predation: consequences for plant demography and evolution. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **1**, 32–46. doi:10.1078/1433-8319-00050
- Hulshof CM, Swenson NG (2010) Variation in leaf functional trait values within and across individuals and species: an example from a Costa Rican dry forest. *Functional Ecology* **24**, 217–223. doi:10.1111/j.1365-2435.2009.01614.x
- Hunt R (1982) 'Plant growth curves. The functional approach to plant growth analysis.' (Edward Arnold: London).
- Ibarra-Manriquez G, Martínez Ramos M, Oyama K (2001) Seedling functional types in a lowland rain forest in México. *American Journal of Botany* **88**, 1801–1812. doi:10.2307/3558356
- Jackson RB (1999) The importance of root distributions for hydrology, biogeochemistry and ecosystem function. In 'Integrating hydrology, ecosystem dynamics and biogeochemistry in complex landscapes'. (Eds JD Tenhunen, P Kabat) pp. 219–240 (Wiley: Chichester, UK).
- Jackson JF, Adams DC, Jackson UB (1999) Allometry of constitutive defense: a model and a comparative test with tree bark and fire regime. *American Naturalist* **153**, 614–632. doi:10.1086/303201
- Jacobsen AL, Pratt RB, Davis SD, Ewers FW (2008) Comparative community physiology: nonconvergence in water relations among three semi-arid shrub communities. *New Phytologist* **180**, 100–113. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02554.x
- Jaureguiberry P, Bertone GA, Díaz S (2011) Device for the standard measurement of shoot flammability in the field. *Austral Ecology* **36**, 821–829. doi:10.1111/j.1442-9993.2010.02222.x
- Jennings DH (1976) The effects of sodium chloride on higher plants. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **51**, 453–486. doi:10.1111/j.1469-185X.1976.tb01064.x
- Jones G, Charles M, Bogaard A, Hodgson J (2010) Crops and weeds: the role of weed functional ecology in the identification of crop husbandry methods. *Journal of Archaeological Science* **37**, 70–77. doi:10.1016/j.jas.2009.08.017
- Jow WM, Bullock SH, Kummerow J (1980) Leaf turnover rates of *Adenostoma fasciculatum* (Rosaceae). *American Journal of Botany* **67**, 256–261. doi:10.2307/2442650
- Juneau KJ, Tarasoff CS (2012) Leaf area and water content changes after permanent and temporary storage. *PLoS ONE* **7**, e42604. doi:10.1371/journal.pone.0042604
- Kammesheidt L (1999) Forest recovery by root suckers and aboveground sprouts after slash-and-burn agriculture, fire and logging in Paraguay and Venezuela. *Journal of Tropical Ecology* **15**, 143–157. doi:10.1017/S0266467499000723
- Kattge J, Díaz S, et al. (2011) TRY—a global database of plant traits. *Global Change Biology* **17**, 2905–2935. doi:10.1111/j.1365-2486.2011.02451.x
- Kazakou E, Violle C, Roumet C, Pintor C, Gimenez O, Garnier E (2009) Litter quality and decomposability of species from a Mediterranean succession depend on leaf traits but not on nitrogen supply. *Annals of Botany* **104**, 1151–1161. doi:10.1093/aob/mcp202
- King DA, Davies SJ, Noor NSM (2006) Growth and mortality are related to adult tree size in a Malaysian mixed dipterocarp forest. *Forest Ecology and Management* **223**, 152–158. doi:10.1016/j.foreco.2005.10.066
- Kitajima K (1994) Relative importance of photosynthetic traits and allocation patterns as correlates of seedling shade tolerance of 13 tropical trees. *Oecologia* **98**, 419–428. doi:10.1007/BF00324232
- Kitajima K (1996) Cotyledon functional morphology, patterns of seed reserve utilization and regeneration niches of tropical tree

- seedlings. In 'The ecology of tropical forest tree seedlings'. (Ed. MD Swaine) pp. 193–210. (UNESCO: Paris)
- Kitajima K, Poorter L (2010) Tissue-level leaf toughness, but not lamina thickness, predicts sapling leaf lifespan and shade tolerance of tropical tree species. *New Phytologist* **186**, 708–721. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03212.x
- Kleyer M, Bekker RM, *et al.* (2008) The LEDA traitbase: a database of life-history traits of the northwest European flora. *Journal of Ecology* **96**, 1266–1274. doi:10.1111/j.1365-2745.2008.01430.x
- Klimeš L, Klimešová J (2005) Clonal traits. In 'The LEDA traitbase. Collecting and measuring standards of life-history traits of the northwest European flora'. (Eds IC Knevel, RM Bekker, D Kunzmann, M Stadler, K Thompson) pp. 66–88. (University of Groningen: Groningen, The Netherlands)
- Klimeš L, Klimešová J, Hendriks RJJ, Van Groenendael JM (1997) Clonal plant architecture: a comparative analysis of form and function. In 'The ecology and evolution of clonal plants'. (Eds H De Kroon, JM Van Groenendael) pp. 1–29. (Backhuys Publishers: Leiden, The Netherlands)
- Klimešová J, Klimeš L (2007) Bud banks and their role in vegetative regeneration – A literature review and proposal for simple classification and assessment. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **8**, 115–129. doi:10.1016/j.ppees.2006.10.002
- Knapp AK, Carter GA (1998) Variability in leaf optical properties among 26 species from a broad range of habitats. *American Journal of Botany* **85**, 940–946. doi:10.2307/2446360
- Knevel C, Bekker RM, Kleyer M (2003) Life-history traits of the northwest European flora: the LEDA database. *Journal of Vegetation Science* **14**, 611–614. doi:10.1111/j.1654-1103.2003.tb02188.x
- Kohyama T, Suzuki E, Partomihardjo T, Yamada T, Kubo T (2003) Tree species differentiation in growth, recruitment and allometry in relation to maximum height in a Bornean mixed dipterocarp forest. *Journal of Ecology* **91**, 797–806. doi:10.1046/j.1365-2745.2003.00810.x
- Kocacinar F, Sage RF (2003) Photosynthetic pathway alters xylem structure and hydraulic function in herbaceous plants. *Plant, Cell & Environment* **26**, 2015–2026. doi:10.1111/j.1365-2478.2003.01119.x
- Korning J, Thomsen K (1994) A new method for measuring tree height in tropical rain forest. *Journal of Vegetation Science* **5**, 139–140. doi:10.2307/3235647
- Lambers H, Poorter H (1992) Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. *Advances in Ecological Research* **23**, 187–261. doi:10.1016/S0065-2504(08)60148-8
- Lambers H, Finnegan PM, Laliberté E, Pearse SJ, Ryan MH, Shane MW, Veneklaas EJ (2011) Phosphorus nutrition of proteaceae in severely phosphorus-impooverished soils: are there lessons to be learned for future crops? *Plant Physiology* **156**, 1058–1066. doi:10.1104/pp.111.174318
- Larson DW (2001) The paradox of great longevity in a short-lived tree species. *Experimental Gerontology* **36**, 651–673. doi:10.1016/S0531-5565(00)00233-3
- Lavorel S, Garnier E (2002) Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Functional Ecology* **16**, 545–556. doi:10.1046/j.1365-2435.2002.00664.x
- Lavorel S, Díaz S, *et al.* (2007) Plant functional types: are we getting any closer to the holy grail? In 'Terrestrial ecosystems in a changing world'. (Ed. PD Canadell JG, Pitelka L) pp. 149–160. (Springer-Verlag: Berlin)
- Lavorel S, Grigulis K, McIntyre S, Williams NSG, Garden D, Dorrough SB, Quétier F, Thébault A, Bonis A (2008) Assessing functional diversity in the field – methodology matters! *Functional Ecology* **22**, 134–147.
- Leck MA, Parker VT, Simpson RL (2008) 'Seedling ecology and evolution.' (Cambridge University Press: Cambridge, UK)
- Leishman MR, Westoby M (1998) Seed size and shape are not related to persistence in soil in Australia in the same way as in Britain. *Functional Ecology* **12**, 480–485. doi:10.1046/j.1365-2435.1998.00215.x
- Leishman M, Wright I, Moles A, Westoby M (2000) The evolutionary ecology of seed size. In 'The ecology of regeneration in plant communities'. 2nd edn. (Ed. M Fenner) pp. 31–57. (CAB International: London)
- Lenz TI, Wright IJ, Westoby M (2006) Interrelations among pressure-volume curve traits across species and water availability gradients. *Physiologia Plantarum* **127**, 423–433. doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00680.x
- Levitt J (1980) 'Responses of plants to environmental stresses.' (Academic Press: New York)
- Linder CR, Moore LA, Jackson RB (2000) A universal molecular method for identifying underground plant parts to species. *Molecular Ecology* **9**, 1549–1559. doi:10.1046/j.1365-294x.2000.01034.x
- Litton CM, Raich JW, Ryan MG (2007) Carbon allocation in forest ecosystems. *Global Change Biology* **13**, 2089–2109. doi:10.1111/j.1365-2486.2007.01420.x
- Loehle C (1988) Tree life histories: the role of defenses. *Canadian Journal of Forest Research* **18**, 209–222. doi:10.1139/x88-032
- Lucas PW, Choong MF, Tan HTW, Turner IM, Berrick AJ (1991) The fracture toughness of the leaf of the dicotyledon *Calophyllum inophyllum* L (Guttiferae). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* **334**, 95–106. doi:10.1098/rstb.1991.0099
- Lucas PW, Turner IM, Dominy NJ, Yamashita N (2000) Mechanical defences to herbivory. *Annals of Botany* **86**, 913–920. doi:10.1006/anbo.2000.1261
- Lüttge U (1997) 'Physiological ecology of tropical plants.' (Springer-Verlag: Berlin)
- Ma S, Baldocchi DD, Mambelli S, Dawson TE (2011) Are temporal variations of leaf traits responsible for

- seasonal and inter-annual variability in ecosystem CO₂ exchange? *Functional Ecology* **25**, 258–270. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01779.x
- Maas EV, Hoffman GJ (1977) Crop salt tolerance – current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division* **103**, 115–134.
- Mace GM, Cramer W, *et al.* (2010) Biodiversity targets after 2010. *Current Opinion in Environmental Sustainability* **2**, 3–8. doi:10.1016/j.cosust.2010.03.003
- Maherali H, DeLucia EH (2001) Influence of climate-driven shifts in biomass allocation on water transport and storage in ponderosa pine. *Oecologia* **129**, 481–491.
- Maherali H, Pockman WT, Jackson RB (2004) Adaptive variation in the vulnerability of woody plants to xylem cavitation. *Ecology* **85**, 2184–2199. doi:10.1890/02-0538
- Mäkelä A, Vanninen P (2001) Vertical structure of Scots pine crowns in different age and size classes. *Trees* **15**, 385–392. doi:10.1007/s004680100118
- Marschner H (2012) ‘Mineral nutrition of higher plants.’ (Academic Press: London)
- Martorell C, Ezcurra E (2007) The narrow-leaf syndrome: a functional and evolutionary approach to the form of fog-harvesting rosette plants. *Oecologia* **151**, 561–573. doi:10.1007/s00442-006-0614-x
- Maseda PH, Fernández RJ (2006) Stay wet or else: three ways in which plants can adjust hydraulically to their environment. *Journal of Experimental Botany* **57**, 3963–3977. doi:10.1093/jxb/erl127
- Mazer J (1989) Ecological, taxonomic, and life history correlates of seed mass among Indiana dune angiosperms. *Ecological Monographs* **59**, 153–175. doi:10.2307/2937284
- McDowell N, Barnard H, *et al.* (2002) The relationship between tree height and leaf area: sapwood area ratio. *Oecologia* **132**, 12–20. doi:10.1007/s00442-002-0904-x
- McGill BJ, Enquist BJ, Weiher E, Westoby M (2006) Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends in Ecology & Evolution* **21**, 178–185. doi:10.1016/j.tree.2006.02.002
- McIntyre S, Lavorel S (2001) Livestock grazing in subtropical pastures: steps in the analysis of attribute response and plant functional types. *Journal of Ecology* **89**, 209–226. doi:10.1046/j.1365-2745.2001.00535.x
- McIntyre S, Lavorel S, Landsberg J, Forbes TDA (1999) Disturbance response in vegetation – towards a global perspective on functional traits. *Journal of Vegetation Science* **10**, 621–630. doi:10.2307/3237077
- Medina E (1999) Tropical forests: diversity and function of dominant life-forms. In ‘Handbook of plant functional ecology’. (Eds FI Pugnaire, F Valladares) pp. 407–448. (Marcel Dekker: New York)
- Meinzer FC, Clearwater MJ, Goldstein G (2001) Water transport in trees: current perspectives, new insights and some controversies. *Environmental and Experimental Botany* **45**, 239–262. doi:10.1016/S0098-8472(01)00074-0
- Mencuccini M (2003) The ecological significance of long-distance water transport: short-term regulation, long-term acclimation and the hydraulic costs of stature across plant life forms. *Plant, Cell & Environment* **26**, 163–182. doi:10.1046/j.1365-3040.2003.00991.x
- Messier J, McGill BJ, Lechowicz MJ (2010) How do traits vary across ecological scales? A case for trait-based ecology. *Ecology Letters* **13**, 838–848. doi:10.1111/j.1461-0248.2010.01476.x
- Meyer LD (1994) Rainfall simulators for soil conservation research. In ‘Soil erosion research methods’. (Ed. R Lal) pp. 83–104. (St Lucie Press: Delray Beach, FL)
- Milla R, Reich PB (2007) Thescaling of leaf area and mass: the cost of light interception increases with leaf size. *Proceedings. Biological Sciences* **274**, 2109–2115. doi:10.1098/rspb.2007.0417
- Milton SJ (1991) Plant spinescence in arid southern Africa – does moisture mediate selection by mammals. *Oecologia* **87**, 279–287. doi:10.1007/BF00325267
- Mohr H, Schopfer P (1995) ‘Plant physiology.’ 4th edn. (Springer: Berlin)
- Moles A, Westoby M (2006) Seed size and plant strategy across the whole life cycle. *Oikos* **113**, 91–105. doi:10.1111/j.0030-1299.2006.14194.x
- Moles A, Ackerly D, Webb C, Tweddle J, Dickie J, Pitman A, Westoby M (2005) Factors that shape seed mass evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**, 10540–10544. doi:10.1073/pnas.0501473102
- Moles AT, Warton DI, Warman L, Swenson NG, Laffan SW, Zanne AE, Pitman A, Hemmings FA, Leishman MR (2009) Global patterns in plant height. *Journal of Ecology* **97**, 923–932. doi:10.1111/j.1365-2745.2009.01526.x
- Moreira B, Tavsanoğlu Ç, Pausas JG (2012) Local versus regional intraspecific variability in regeneration traits. *Oecologia* **168**, 671–677. doi:10.1007/s00442-011-2127-5
- Munns R, Husain S, Rivelli AR, James RA, Condon AG, Lindsay MP, Lagudah ES, Schachtman DP, Hare RA (2002) Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. *Plant and Soil* **247**, 93–105. doi:10.1023/A:1021119414799
- Mutch RW (1970) Wildland fires and ecosystems – A hypothesis. *Ecology* **51**, 1046–1051. doi:10.2307/1933631
- Myers J, Vellend M, Gardescu S, Marks P (2004) Seed dispersal by white-tailed deer: implications for long-distance dispersal, invasion, and migration of plants in eastern North America. *Oecologia* **139**, 35–44. doi:10.1007/s00442-003-1474-2
- Newman EI (1966) A method of estimating the total root length of a sample. *Journal of Applied Ecology* **3**, 139–145. doi:10.2307/2401670
- Ng FSP (1978) Strategies of establishment in Malayan forest trees. In ‘Tropical trees as living systems’. (Eds PB Tomlinson, MH Zimmerman) pp. 129–162. (Cambridge University Press: Cambridge, UK)

- Niinemets Ü (2001) Global-scale climatic controls of leaf dry mass per area, density and thickness in trees and shrubs. *Ecology* **82**, 453–469. doi:10.1890/0012-9658(2001)082[0453:GSCCOL]2.0.CO;2
- Niinemets Ü, Portsmouth A, Tena D, Tobias M, Matesanz S, Valladares F (2007) Do we underestimate the importance of leaf size in plant economics? Disproportional scaling of support costs within the spectrum of leaf physiognomy. *Annals of Botany* **100**, 283–303. doi:10.1093/aob/mcm107
- Niklas KJ (1994) ‘Plant allometry: the scaling of form and process.’ (The University of Chicago Press: Chicago, IL)
- Niklas KJ, Cobb ED, Niinemets U, Reich PB, Sellin A, Shipley B, Wright J (2007) “Diminishing returns” in the scaling of functional leaf traits across and within species groups. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **104**, 8891–8896. doi:10.1073/pnas.0701135104
- Noble R, Slatyer RO (1980) The use of vital attributes to predict successional changes in plant communities subject to recurrent disturbances. *Vegetatio* **43**, 5–21. doi:10.1007/BF00121013
- North GB, Noble PS (1992) Drought-induced changes in hydraulic conductivity and structure in roots of *Ferocactus acanthodes* and *Opuntia ficus-indica*. *New Phytologist* **120**, 9–19. doi:10.1111/j.1469-8137.1992.tb01053.x
- O’Leary MH (1981) Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry* **20**, 553–567. doi:10.1016/0031-9422(81)85134-5
- Olf H, Vera FWM, Bokdam J, Bakker ES, Gleichman JM, de Maeyer K, Smit R (1999) Shifting mosaics in grazed woodlands driven by the alternation of plant facilitation and competition. *Plant Biology* **1**, 127–137. doi:10.1111/j.1438-8677.1999.tb00236.x
- Ollinger SV, Richardson AD, *et al.* (2008) Canopy nitrogen, carbon assimilation, and albedo in temperate and boreal forests: functional relations and potential climate feedbacks. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **105**, 19336–19341. doi:10.1073/pnas.0810021105
- Onipchenko VG, Makarov MI, Van Logtestijn RSP, Ivanov VB, Akhmetzanova AA, Teekev DK, Ermak AA, Salpargarova FS, Kozhevnikova AD, Cornelissen JHC (2009) New nitrogen uptake strategy: specialized snow roots. *Ecology Letters* **12**, 758–764. doi:10.1111/j.1461-0248.2009.01331.x
- Onoda Y, Schieving F, Anten NPR (2008). Effects of light and nutrient availability on leaf mechanical properties of *Plantago major*: a conceptual approach. *Annals of Botany* **101**, 727–736.
- Onoda Y, Westoby M, *et al.* (2011) Global patterns of leaf mechanical properties. *Ecology Letters* **14**, 301–312. doi:10.1111/j.1461-0248.2010.01582.x
- Ordoñez JC, Van Bodegom PM, Witte J-PM, Bartholomeus RP, Van Hal JR, Aerts R (2010) Plant strategies in relation to resource supply in mesic to wet environments: does theory mirror nature? *American Naturalist* **175**, 225–239. doi:10.1086/649582
- Pakeman RJ, Quested HM (2007) Sampling plant functional traits: what proportion of the species need to be measured? *Applied Vegetation Science* **10**, 91–96. doi:10.1111/j.1654-109X.2007.tb00507.x
- Pammenter NW, Van der Willigen C (1998) A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. *Tree Physiology* **18**, 589–593. doi:10.1093/treephys/18.8-9.589
- Papió C, Trabaud L (1990) Structural characteristics of fuel components of five Mediterranean shrubs. *Forest Ecology and Management* **35**, 249–259. doi:10.1016/0378-1127(90)90006-W
- Parkhurst DF (1994) Diffusion of CO₂ and other gases inside leaves. *New Phytologist* **126**, 449–479. doi:10.1111/j.1469-8137.1994.tb04244.x
- Parkhurst DF, Loucks OL (1972) Optimal leaf size in relation to environment. *Journal of Ecology* **60**, 505–537. doi:10.2307/2258359
- Parton W, Silver WL, *et al.* (2007) Global-scale similarities in nitrogen release patterns during long-term decomposition. *Science* **315**, 361–364. doi:10.1126/science.1134853
- Patiño S, Lloyd J, *et al.* (2009) Branch xylem density variations across the Amazon Basin. *Biogeosciences* **6**, 545–568. doi:10.5194/bg-6-545-2009
- Patiño S, Fyllas NM, *et al.* (2012) Coordination of physiological and structural traits in Amazon forest trees. *Biogeosciences* **9**, 775–801. doi:10.5194/bg-9-775-2012
- Paula S, Pausas JG (2006) Leaf traits and resprouting ability in the Mediterranean basin. *Functional Ecology* **20**, 941–947. doi:10.1111/j.1365-2435.2006.01185.x
- Paula S, Pausas JG (2011) Root traits explain different foraging strategies between resprouting life histories. *Oecologia* **165**, 321–331. doi:10.1007/s00442-010-1806-y
- Paula S, Arianoutsou M, *et al.* (2009) Fire-related traits for plant species of the Mediterranean Basin. *Ecology* **90**, 1420. doi:10.1890/08-1309.1
- Pausas JG (1997) Resprouting of *Quercus suber* in NE Spain after fire. *Journal of Vegetation Science* **8**, 703–706. doi:10.2307/3237375
- Pausas JG, Bradstock RA (2007) Fire persistence traits of plants along a productivity and disturbance gradient in mediterranean shrublands of south-east Australia. *Global Ecology and Biogeography* **16**, 330–340. doi:10.1111/j.1466-8238.2006.00283.x
- Pausas JG, Alessio GA, Moreira B, Corcobado G (2012) Fires enhance flammability in *Ulex parviflorus*.

- New Phytologist* **193**, 18–23. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03945.x
- Peco B, Traba J, Levassor C, Sánchez AM, Azcárate FM (2003) Seed size, shape and persistence in dry Mediterranean grass and scrublands. *Seed Science Research* **13**, 87–95. doi:10.1079/SSR2002127
- Pérez-Harguindeguy N, Díaz S, Vendramini F, Cornelissen JHC, Gurvich DE, Cabido M (2003) Leaf traits and herbivore selection in the field and in cafeteria experiments. *Austral Ecology* **28**, 642–650. doi:10.1046/j.1442-9993.2003.01321.x
- Pickett STA, Kempf JS (1980) Branching patterns in forest shrubs and understory trees in relation to habitat. *New Phytologist* **86**, 219–228. doi:10.1111/j.1469-8137.1980.tb03191.x
- Pierce S, Winter K, Griffiths H (2002) Carbon isotope ratio and the extent of daily CAM use by Bromeliaceae. *New Phytologist* **156**, 75–83. doi:10.1046/j.1469-8137.2002.00489.x
- Pisani JM, Distel RA (1998) Inter- and intraspecific variations in production of spines and phenols in *Prosopis caldenia* and *Prosopis flexuosa*. *Journal of Chemical Ecology* **24**, 23–36. doi:10.1023/A:1022380627261
- Pons J, Pausas JG (2007) Acorn dispersal estimated by radio-tracking. *Oecologia* **153**, 903–911. doi:10.1007/s00442-007-0788-x
- Poorter L, Bongers F (2006) Leaf traits are good predictors of plant performance across 53 rain forest species. *Ecology* **87**, 1733–1743. doi:10.1890/0012-9658(2006)87[1733:LTA GPO]2.0.CO;2
- Poorter H, Garnier E (1999) Ecological significance of relative growth rate and its components. In 'Handbook of functional plant ecology'. (Eds FI Pugnaire, F Valladares) pp. 81–120. (Marcel Dekker: New York)
- Poorter H, Garnier E (2007) The ecological significance of variation in relative growth rate and its components. In 'Functional plant ecology'. (Eds FI Pugnaire, F Valladares) pp. 67–100. (CRC press: Boca Raton, FL)
- Poorter H, Lewis C (1986) Testing differences in relative growth rate: a method avoiding curve fitting and pairing. *Physiologia Plantarum* **67**, 223–226. doi:10.1111/j.1399-3054.1986.tb02447.x
- Poorter H, Nagel O (2000) The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**, 595–607. doi:10.1071/PP99173_CO
- Poorter H, Rozendaal DMA (2008) Leaf size and leaf display of thirty-eight tropical tree species. *Oecologia* **158**, 35–46. doi:10.1007/s00442-008-1131-x
- Poorter H, Welschen RAM (1993). Analyzing variation in RGR in terms of the underlying carbon economy. In 'Methods in comparative plant ecology – a laboratory manual'. (Eds GAF Hendry, JP Grime) pp. 107–110. (Chapman and Hall: London)
- Poorter L, Bongers L, Bongers F (2006) Architecture of 54 moist-forest tree species: traits, trade-offs, and functional groups. *Ecology* **87**, 1289–1301. doi:10.1890/0012-9658(2006)87[1289:AOMTST]2.0.CO;2
- Poorter L, Wright SJ, *et al.* (2008) Are functional traits good predictors of demographics rates? Evidence from five neotropical forests. *Ecology* **89**, 1908–1920. doi:10.1890/07-0207.1
- Poorter H, Niinemets Ü, Poorter L, Wright IJ, Villar R (2009) Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytologist* **182**, 565–588. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02830.x
- Poorter L, Kitajima K, Mercado P, Chubiña J, Melgar I, Prins HHT (2010) Resprouting as a persistence strategy of tropical forest trees: its relation with carbohydrate storage and shade tolerance. *Ecology* **91**, 2613–2627. doi:10.1890/09-0862.1
- Poorter H, Niklas KJ, Reich PB, Oleksyn J, Poot P, Mommer L (2012) Tansley review. Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. *New Phytologist* **193**, 30–50. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03952.x
- Poschlod P, Kiefer S, Tränkle U, Bonn S (1998) Plant species richness in calcareous grasslands as affected by dispersability in space and time. *Applied Vegetation Science* **1**, 75–91. doi:10.2307/1479087
- Poschlod P, Kleyer M, Tackenberg O (2000) Databases on life history traits as a tool for risk assessment in plant species. *Zeitschrift für Ökologie und Naturschutz* **9**, 3–18.
- Poschlod P, Tackenberg O, Bonn S (2005) Plant dispersal potential and its relation to species frequency and coexistence. In 'Vegetation ecology'. (Ed. E Van der Maarel). pp. 147–171 (Blackwell: Oxford, UK)
- Pregitzer KS, DeForest JL, Burton AJ, Allen MF, Ruess RW, Hendrick RL (2002) Fine root architecture of nine North American trees. *Ecology* **72**, 293–309.
- Preston KA, Ackerly DD (2003) Hydraulic architecture and the evolution of shoot allometry in contrasting climates. *American Journal of Botany* **90**, 1502–1512. doi:10.3732/ajb.90.10.1502
- Price CA, Symonova O, Mileyko Y, Hilley T, Weitz J (2011) Leaf extraction and analysis framework graphical user interface: segmenting and analyzing the structure of leaf veins and areoles. *Plant Physiology* **155**, 236–245. doi:10.1104/pp.110.162834
- Puigdefábregas J, Pugnaire FI (1999) Plant survival in arid environments. In 'Handbook of functional plant ecology'. (Eds FI Pugnaire, F Valladares) pp. 381–405. (Marcel Dekker: New York)
- Putz FE, Phyllis DC, Lu K, Montalvo A, Aiello A (1983) Uprooting and snapping of trees: structural determinants and ecological consequences. *Canadian Journal of Forest Research* **13**, 1011–1020. doi:10.1139/x83-133
- Pyankov VI, Gunin PD, Tsoog S, Black CC (2000) C-4 plants in the vegetation of Mongolia: their natural occurrence and geographical distribution in relation to climate. *Oecologia* **123**, 15–31. doi:10.1007/s004420050985

- Rabotnov TA (1950) The life cycle of perennial herbaceous plants in meadow coenoses. *Trudy Botanicheskogo Instituta Akademii Nauk SSSR Seriya III* **6**, 7–204. [In Russian]
- Raunkiaer C (1934) ‘The life forms of plants and statistical plant geography.’ (Clarendon Press: Oxford, UK)
- Read J, Stokes A (2006) Plant biomechanics in an ecological context. *American Journal of Botany* **93**, 1546–1565. doi:10.3732/ajb.93.10.1546
- Rebollo S, Milchunas DG, Noy-Meir I, Chapman PL (2002) The role of a spiny plant refuge in structuring grazed shortgrass steppe plant communities. *Oikos* **98**, 53–64. doi:10.1034/j.1600-0706.2002.980106.x
- Rees M, Osborne CP, Woodward FI, Hulme SP, Turnbull LA, Taylor SH (2010) Partitioning the components of relative growth rate: how important is plant size variation? *American Naturalist* **176**, E152–E161. doi:10.1086/657037
- Reich PB (2002) Root-shoot relations: optimality in acclimation and adaptation or the ‘Emperor’s new clothes?’ In ‘Plant roots: the hidden half’. (Eds Y Waisel, A Eshel, U Kafkafi) pp. 314–338 (Marcel Dekker: New York).
- Reich PB, Uhl C, Walters MB, Ellsworth DS (1991a) Leaf lifespan as a determinant of leaf structure and function among 23 Amazonian tree species. *Oecologia* **86**, 16–24. doi:10.1007/BF00317383
- Reich PB, Walters MB, Ellsworth DS (1991b) Leaf age and season influence the relationships between leaf nitrogen, leaf mass per area and photosynthesis in maple and oak trees. *Plant, Cell & Environment* **14**, 251–259. doi:10.1111/j.1365-3040.1991.tb01499.x
- Reich PB, Walters MB, Ellsworth DS (1992) Leaf life-span in relation to leaf, plant and stand characteristics among diverse ecosystems. *Ecological Monographs* **62**, 365–392. doi:10.2307/2937116
- Reich PB, Walters MB, Ellsworth DS (1997) From tropics to tundra: global convergence in plant functioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **94**, 13730–13734. doi:10.1073/pnas.94.25.13730
- Reich PB, Tjoelker MG, Walters MB, Vanderklein DW, Bushena C (1998) Close association of RGR, leaf and root morphology, seed mass and shade tolerance in seedlings of nine boreal tree species grown in high and low light. *Functional Ecology* **12**, 327–338. doi:10.1046/j.1365-2435.1998.00208.x
- Reich PB, Ellsworth DS, Walters MB, Vose JM, Gresham C, Volin JC, Bowman WD (1999) Generality of leaf trait relationships: a test across six biomes. *Ecology* **80**, 1955–1969. doi:10.1890/0012-9658(1999)080[1955:GOLT RA]2.0.CO;2
- Reich PB, Tilman D, Naeem S, Ellsworth DS, Knops J, Craine J, Wedin D, Trost J (2004) Species and functional group diversity independently influence biomass accumulation and its response to CO₂ and N. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **101**, 10101–10106. doi:10.1073/pnas.0306602101
- Reich PB, Tjoelker MG, Pregitzer KS, Wright IJ, Oleksyn J, Machado JL (2008) Scaling of respiration to nitrogen in leaves, stems and roots of higher land plants. *Ecology Letters* **11**, 793–801. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01185.x
- Reich PB, Oleksyn J, Wright IJ, Niklas KJ, Hedin L, Elser J (2010) Evidence of a general 2/3-power law of scaling leaf nitrogen to phosphorus among major plant groups and biomes. *Proceedings. Biological Sciences* **277**, 877–883. doi:10.1098/rspb.2009.1818
- Reyes G, Brown S, Chapman J, Lugo AE (1992) Wood densities of tropical tree species. General technical report S0-88. US Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, New Orleans, LA.
- Richter M (1992) Methods of interpreting climatological conditions based on phytomorphological characteristics in the cordilleras of the Neotropics. *Plant Research and Development* **36**, 89–114.
- Robertson GP, Coleman DC, Bledsoe CS, Sollins P (1999) ‘Standard soil methods for long-term ecological research.’ (Oxford University Press: Oxford, UK)
- Rodriguez-Calcerrada J, Atkin OK, Robson TM, Zaragoza-Castells J, Gil L, Aranda I (2010) Thermal acclimation of leaf dark respiration of beech seedlings experiencing summer drought in high and low light environments. *Tree Physiology* **30**, 214–224. doi:10.1093/treephys/tpp104
- Römermann C, Tackenberg O, Poschlod P (2005a) How to predict attachment potential of seeds to sheep and cattle coat from simple morphological seed traits. *Oikos* **110**, 219–230. doi:10.1111/j.0030-1299.2005.13911.x
- Römermann C, Tackenberg O, Poschlod P (2005b) Buoyancy. In ‘The LEDA traitbase collecting and measuring standards’. (Eds IC Knevel, RM Bekker, D Kunzmann, M Stadler, K Thompson) pp. 124–127. (Groningen University: Groningen, The Netherlands)
- Römermann C, Tackenberg O, Poschlod P (2005c) External animal dispersal (epizoochory). In ‘The LEDA traitbase collecting and measuring standards’. (Eds IC Knevel, RM Bekker, D Kunzmann, M Stadler, K Thompson) pp. 127–129. (Groningen University: Groningen, The Netherlands)
- Roth-Nebelsick A, Uhl D, Mosbrugger V, Kerp H (2001) Evolution and function of leaf venation architecture: a review. *Annals of Botany* **87**, 553–566. doi:10.1006/anbo.2001.1391
- Rothermel RC (1972) A mathematical model for predicting fire spread in wildland fuels. USDA Forest Service Research Paper INT. USDA Forest Service, 1400 Independence Ave., SW Washington, D.C. 20250, USA.
- Roumet C, Urcelay C, Diaz S (2006) Suites of root traits differ between annual and perennial species growing in the field. *New Phytologist* **170**, 357–368. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01667.x

- Royer DL, McElwain JC, Adams JM, Wilf P (2008) Sensitivity of leaf size and shape to climate within *Acer rubrum* and *Quercus kelloggii*. *New Phytologist* **179**, 808–817. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02496.x
- Rozema J, Bijwaard P, Prast G, Broekman R (1985) Ecophysiological adaptations of coastal halophytes from foredunes and salt marshes. *Vegetatio* **62**, 499–521. doi:10.1007/BF00044777
- Rozema J, Weijers S, Broekman R, Blokker P, Buizer B, Werleman C, Yaqine HE, Hoogedoorn H, Mayoral Fuertes M, Cooper E (2009) Annual growth of *Cassiope tetragona* as a proxy for Arctic climate: developing correlative and experimental transfer functions to reconstruct past summer temperature on a millennial time scale. *Global Change Biology* **15**, 1703–1715. doi:10.1111/j.1365-2486.2009.01858.x
- Rundel PW (1991) Shrub life-forms. In 'Response of plants to multiple stresses'. (Eds HA Mooney, WE Winner, EJ Pell) pp. 345–370. (Academic Press: San Diego, CA)
- Ryser P, Bernardi J, Merla A (2008) Determination of leaf fresh mass after storage between moist paper towels: constraints and reliability of the method. *Journal of Experimental Botany* **59**, 2461–2467. doi:10.1093/jxb/ern120
- Sack L, Frole K (2006) Leaf structural diversity is related to hydraulic capacity in tropical rain forest trees. *Ecology* **87**, 483–491. doi:10.1890/05-0710
- Sack L, Holbrook NM (2006) Leaf hydraulics. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 361–381. doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144141
- Sack L, Grubb PJ, Marañón T (2003) The functional morphology of juvenile plants tolerant of strong summer drought in shaded forest understories in southern Spain. *Plant Ecology* **168**, 139–163. doi:10.1023/A:1024423820136
- Sack L, Cornwell WK, Santiago LS, Barbour MM, Choat B, Evans JR, Munns R, Nicotra A (2010) A unique web resource for physiology, ecology and the environmental sciences: PrometheusWiki. *Functional Plant Biology* **37**, 687–693. doi:10.1071/FP10097
- Sage RF (2001) Environmental and evolutionary preconditions for the origin and diversification of the C₄ photosynthetic syndrome. *Plant Biology* **3**, 202–213. doi:10.1055/s-2001-15206
- Santiago LS, Goldstein G, Meinzer FC, Fisher JB, Machado K, Woodruff D, Jones T (2004) Leaf photosynthetic traits scale with hydraulic conductivity and wood density in Panamanian forest canopy trees. *Oecologia* **140**, 543–550. doi:10.1007/s00442-004-1624-1
- Scarff FR, Westoby M (2006) Leaf litter flammability in some semi-arid Australian woodlands. *Functional Ecology* **20**, 745–752. doi:10.1111/j.1365-2435.2006.01174.x
- Schenk HJ, Jackson RB (2002) The global biogeography of roots. *Ecological Monographs* **72**, 311–328. doi:10.1890/0012-9615(2002)072[0311:TGBOR]2.0.CO;2
- Scholander PF (1966) The role of solvent pressure in osmotic systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **55**, 1407–1414. doi:10.1073/pnas.55.6.1407
- Schurr FM, Bond WJ, Midgley GF, Higgins SI (2005) A mechanistic model for secondary seed dispersal by wind and its experimental validation. *Journal of Ecology* **93**, 1017–1028. doi:10.1111/j.1365-2745.2005.01018.x
- Schweingruber FH (1996) 'Tree rings and environment. Dendroecology.' (Haupt-Verlag: Bern, Switzerland)
- Schweingruber FH, Poschlod P (2005) Growth rings in herbs and shrubs: life span, age determination and stem anatomy. *Forest Snow and Landscape Research* **79**, 195–415.
- Schwilk DW, Ackerly DD (2001) Flammability and serotiny as strategies: correlated evolution in pines. *Oikos* **94**, 326–336. doi:10.1034/j.1600-0706.2001.940213.x
- Seibt U, Rajabi A, Griffiths H, Berry JA (2008) Carbon isotopes and water use efficiency: sense and sensitivity. *Oecologia* **155**, 441–454. doi:10.1007/s00442-007-0932-7
- Seiwa K, Kikuzawa K (1996) Importance of seed size for the establishment of seedlings of five deciduous broad-leaved tree species. *Vegetatio* **123**, 51–64. doi:10.1007/BF00044887
- Shipley B (1995) Structured interspecific determinants of specific leaf area in 34 species of herbaceous angiosperms. *Functional Ecology* **9**, 312–319. doi:10.2307/2390579
- Shipley B, Vu TT (2002) Dry matter content as a measure of dry matter concentration in plants and their parts. *New Phytologist* **153**, 359–364. doi:10.1046/j.0028-646X.2001.00320.x
- Singer MC (2000) Reducing ambiguity in describing plant-insect interactions: 'preference', 'acceptability' and 'electivity'. *Ecology Letters* **3**, 159–162. doi:10.1046/j.1461-0248.2000.00136.x
- Skinner FK, Rotenberg Y, Neumann AW (1989) Contact angle measurements from the contact diameter of sessile drops by means of a modified axisymmetric drop shape analysis. *Journal of Colloid and Interface Science* **130**, 25–34. doi:10.1016/0021-9797(89)90074-X
- Smith WK, Bell DT, Shepherd KA (1998) Associations between leaf structure, orientation, and sunlight exposure in five Western Australian communities. *American Journal of Botany* **85**, 56–63. doi:10.2307/2446554
- Southwood TRE (1977) Habitat, the templet for ecological strategies? *Journal of Animal Ecology* **43**, 337–365.
- Southwood TRE, Brown VK, Reader PM (1986) Leaf palatability, life expectancy and herbivore damage. *Oecologia* **70**, 544–548. doi:10.1007/BF00379901
- Sperry JS (2003) Evolution of water transport and xylem structure. *International Journal of Plant Sciences* **164**, S115–S127. doi:10.1086/368398

- Sperry JS, Donnelly JR, Tyree MT (1988) A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant, Cell & Environment* **11**, 35–40. doi:10.1111/j.1365-3040.1988.tb01774.x
- Sperry JS, Meinzer FC, McCulloh KA (2008a) Safety and efficiency conflicts in hydraulic architecture: scaling from tissues to trees. *Plant, Cell & Environment* **31**, 632–645. doi:10.1111/j.1365-3040.2007.01765.x
- Sperry JS, Tameda H, Bush SE, Hacke UG (2008b) Evaluation of centrifugal methods for measuring xylem cavitation in conifers, diffuse and ring-porous angiosperms. *New Phytologist* **177**, 558–568.
- Srivastava DS, Cadotte MW, MacDonald AAM, Marushia RG, Mirotnick N (2012) Phylogenetic diversity and the functioning of ecosystems. *Ecology Letters* **15**, 637–648. doi:10.1111/j.1461-0248.2012.01795.x
- Staver AC, Bond WJ, February EC (2011) History matters: tree establishment variability and species turnover in an African savanna. *Ecosphere* **2**, 1–12. doi:10.1890/ES11-00029.1
- Stephens SL, Gordon DA, Martin RE (1994) Combustibility of selected domestic vegetation subjected to desiccation. In '12th conference on fire and forest meteorology'. (Jekyll Island, GA)
- Stedde E (2001) Water uptake by plant roots: an integration of views. In 'Recent advances of plant root structure and function'. (Eds O Gašpariková, M Ciamporová, I Mistrík, F Baluška) pp. 71–82. (Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands)
- Stich B, Piepho H-P, Schulz B, Melchinger AE (2008) Multi-trait association mapping in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **117**, 947–954. doi:10.1007/s00122-008-0834-z
- Strauss SY, Agrawal AA (1999) The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* **14**, 179–185. doi:10.1016/S0169-5347(98)01576-6
- Swenson NG, Enquist BJ (2008) The relationship between stem and branch specific gravity and the ability of each measure to predict leaf area. *American Journal of Botany* **95**, 516–519. doi:10.3732/ajb.95.4.516
- Tackenberg O (2003) Modeling long distance dispersal of plant diaspores by wind. *Ecological Monographs* **73**, 173–189. doi:10.1890/0012-9615(2003)073[0173:MLDOP]2.0.CO;2
- Tackenberg O, Poschlod P, Bonn S (2003) Assessment of wind dispersal potential in plant species. *Ecological Monographs* **73**, 191–205. doi:10.1890/0012-9615(2003)073[0191:AOWDPI]2.0.CO;2
- Taiz L, Zeiger E (2010) 'Plant physiology.' (The Benjamin/Cummings Publishing: Redwood City, CA)
- Tamm CO (1972) Survival and flowering of some perennial herbs. II. The behaviour of some orchids on permanent plots. *Oikos* **23**, 23–28. doi:10.2307/3543923
- Taylor B, Parkinson D (1988) A new microcosm approach to litter decomposition studies. *Canadian Journal of Botany* **66**, 1933–1939.
- Temminghoff EEJM, Houba VJG (2004) 'Plant analyses procedures.' (Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands).
- Tennant D (1975) A test of a modified line intersect method of estimating root length. *Journal of Ecology* **63**, 995–1001. doi:10.2307/2258617
- Thomas SC (1996) Asymptotic height as a predictor of growth and allometric characteristics in Malaysian rain forest trees. *American Journal of Botany* **83**, 556–566. doi:10.2307/2445913
- Thompson K, Band SR, Hodgson JG (1993) Seed size and shape predict seed persistence in the soil. *Functional Ecology* **7**, 236–241. doi:10.2307/2389893
- Thompson K, Bakker JP, Bekker RM (1997) 'The soil seed bank of North West Europe: methodology, density and longevity.' (Cambridge University Press: Cambridge, UK)
- Tjoelker MG, Oleksyn J, Reich PB (2001) Modelling respiration of vegetation: evidence for a general temperature-dependent Q_{10} . *Global Change Biology* **7**, 223–230. doi:10.1046/j.1365-2486.2001.00397.x
- Turner NC (1988) Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. *Irrigation Science* **9**, 289–308. doi:10.1007/BF00296704
- Turner IM (1994) Sclerophylly: primarily protective? *Functional Ecology* **8**, 669–675. doi:10.2307/2390225
- Tyree MT, Sperry JS (1989) Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 19–36. doi:10.1146/annurev.pp.40.060189.000315
- Tyree MT, Zimmermann MH (2002) 'Xylem structure and the ascent of sap.' (Springer-Verlag: Berlin)
- Uhl D, Mosbrugger V (1999) Leaf venation density as a climate and environmental proxy: a critical review and new data. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **149**, 15–26. doi:10.1016/S0031-0182(98)00189-8
- Vaieretti MV, Díaz S, Vile D, Garnier E (2007) Two measurement methods of leaf dry matter content produce similar results in a broad range of species. *Annals of Botany* **99**, 955–958. doi:10.1093/aob/mcm022
- Valette J-C (1997) Inflammabilities of Mediterranean species. In 'Forest fire risk and management. EUR 16719 EN'. (Ed. P Balabanis, F Eftichidis, R Fantechi) pp. 51–64. (European Commission, Environment and Quality of Life: Brussels)
- Van Altena C, Van Logtestijn RSP, Cornwell WK, Cornelissen JHC (2012) Species composition and fire: non-additive mixture effects on ground fuel flammability. *Frontiers in Plant Science* **3**, 63.
- Van der Pijl L (1982) 'Principles of dispersal in higher plants.' (Springer-Verlag: Berlin)

- Van Gelder HA, Poorter L, Sterck FJ (2006) Wood mechanics, allometry, and life-history variation in a tropical rain forest tree community. *New Phytologist* **171**, 367–378. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01757.x
- Van Groenendael JM, Klimeš L, Klimešova J, Hendriks RJJ (1997) Comparative ecology of clonal plants. In 'Plant life histories'. (Eds JL Harper, J Silvertown, M Franco) pp. 191–209. (Cambridge University Press: Cambridge, UK)
- Vendramini F, Díaz S, Gurvich DE, Wilson PJ, Thompson K, Hodgson JG (2002) Leaf traits as indicators of resource-use strategy in floras with succulent species. *New Phytologist* **154**, 147–157. doi:10.1046/j.1469-8137.2002.00357.x
- Veneklaas EJ, Poorter L (1998) Growth and carbon partitioning of tropical tree seedlings in contrasting light environments. In 'Inherent variation in plant growth'. (Eds H Lambers, H Poorter, MMI Van Vuuren) pp. 337–361. (Backhuys Publishers: Leiden, The Netherlands)
- Veneklaas EJ, Zagt RJ, Van Leerdam A, Van Ek R, Broekhoven AJ, Van Genderen M (1990) Hydrological properties of the epiphyte mass of a montane tropical rain forest, Colombia. *Vegetatio* **89**, 183–192. doi:10.1007/BF00032170
- Vesk PA, Westoby M (2004) Sprouting ability across diverse disturbances and vegetation types worldwide. *Journal of Ecology* **92**, 310–320. doi:10.1111/j.0022-0477.2004.00871.x
- Vile D, Garnier E, *et al.* (2005) Specific leaf area and dry matter content estimate thickness in laminar leaves. *Annals of Botany* **96**, 1129–1136. doi:10.1093/aob/mci264
- Violle C, Navas M-L, Vile D, Kazakou E, Fortunel C, Hummel I, Garnier E (2007) Let the concept of trait be functional! *Oikos* **116**, 882–892. doi:10.1111/j.0030-1299.2007.15559.x
- Wahl S, Ryser P (2000) Root tissue structure is linked to ecological strategies of grasses. *New Phytologist* **148**, 459–471. doi:10.1046/j.1469-8137.2000.00775.x
- Walters MB, Reich PB (1999) Low-light carbon balance and shade tolerance in the seedlings of woody plants: do winter deciduous and broad-leaved evergreen species differ? *New Phytologist* **143**, 143–154. doi:10.1046/j.1469-8137.1999.00425.x
- Wand SJE, Midgley GG, Jones MH, Curtis PS (1999) Responses of wild C₄ and C₃ grasses (Poaceae) species to elevated atmospheric CO₂ concentration: a meta-analytical test of current theories and perceptions. *Global Change Biology* **5**, 723–741. doi:10.1046/j.1365-2486.1999.00265.x
- Weihner E, Clarke GDP, Keddy PA (1998) Community assembly rules, morphological dispersion, and the coexistence of plant species. *Oikos* **81**, 309–322. doi:10.2307/3547051
- Weihner E, Van der Werf A, Thompson K, Roderick M, Garnier E, Eriksson O (1999) Challenging Theophrastus: a common core list of plant traits for functional ecology. *Journal of Vegetation Science* **10**, 609–620. doi:10.2307/3237076
- Westoby M (1998) A leaf-height-seed (LHS) plant ecology strategy scheme. *Plant and Soil* **199**, 213–227. doi:10.1023/A:1004327224729
- Westoby M, Cunningham SA, Fonseca C, Overton J, Wright IJ (1998) Phylogeny and variation in light capture area deployed per unit investment in leaves: designs for selecting study species with a view to generalizing. In 'Variation in growth rate and productivity of higher plants'. (Eds H Lambers, H Poorter H, MMI Van Vuuren) pp. 539–566. (Backhuys Publishers: Leiden, The Netherlands)
- Westoby M, Warton D, Reich PB (2000) The time value of leaf area. *American Naturalist* **155**, 649–656. doi:10.1086/303346
- Westoby M, Falster D, Moles A, Vesk P, Wright I (2002) Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology and Systematics* **33**, 125–159. doi:10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150452
- Whittaker RH (1975) 'Communities and ecosystems.' 2nd edn. (Macmillan Publishing: New York)
- Will H, Tackenberg O (2008) A mechanistic simulation model of seed dispersal by animals. *Journal of Ecology* **96**, 1011–1022. doi:10.1111/j.1365-2745.2007.01341.x
- Williamson GB, Wiemann MC (2010) Measuring wood specific gravity... Correctly. *American Journal of Botany* **97**, 519–524. doi:10.3732/ajb.0900243
- Wilson PJ, Thompson K, Hodgson JG (1999) Specific leaf area and leaf dry matter content as alternative predictors of plant strategies. *New Phytologist* **143**, 155–162. doi:10.1046/j.1469-8137.1999.00427.x
- Withington JM, Reich B, Oleksyn J, Eissenstat DM (2006) Comparisons of structure and life span in roots and leaves among temperate trees. *Ecological Monographs* **76**, 381–397. doi:10.1890/0012-9615(2006)076[0381:COSALS]2.0.CO;2
- Witkowski ETF, Lamont BB (1991) Leaf specific mass confounds leaf density and thickness. *Oecologia* **88**, 486–493.
- Wong S-C, Cowan IR, Farquhar GD (1979) Stomatal conductance correlates with photosynthetic capacity. *Nature* **282**, 424–426. doi:10.1038/282424a0
- Wong S-C, Cowan IR, Farquhar GD (1985a) Leaf conductance in relation to rate of CO₂ assimilation. I. Influence of nitrogen nutrition, phosphorus nutrition, photon flux density, and ambient partial pressure of CO₂ during ontogeny. *Plant Physiology* **78**, 821–825. doi:10.1104/pp.78.4.821
- Wong S-C, Cowan IR, Farquhar GD (1985b) Leaf conductance in relation to rate of CO₂ assimilation. II. Effects of short-term exposures to different photon flux

- densities. *Plant Physiology* **78**, 826–829. doi:10.1104/pp.78.4.826
- Wong S-C, Cowan IR, Farquhar GD (1985c) Leaf conductance in relation to rate of CO₂ assimilation. III. Influences of water stress and photoinhibition. *Plant Physiology* **78**, 830–834. doi:10.1104/pp.78.4.830
- Wright IJ, Cannon K (2001) Relationships between leaf lifespan and structural defences in a low-nutrient, sclerophyll flora. *Functional Ecology* **15**, 351–359. doi:10.1046/j.1365-2435.2001.00522.x
- Wright W, Illius AW (1995) A comparative study of the fracture properties of 5 grasses. *Functional Ecology* **9**, 269–278. doi:10.2307/2390573
- Wright W, Vincent JFK (1996) Herbivory and the mechanics of fracture in plants. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **71**, 401–413. doi:10.1111/j.1469-185X.1996.tb01280.x
- Wright IJ, Westoby M (2002) Leaves at low versus high rainfall: coordination of structure, lifespan and physiology. *New Phytologist* **155**, 403–416. doi:10.1046/j.1469-8137.2002.00479.x
- Wright IJ, Clifford HT, Kidson R, Reed ML, Rice BL, Westoby M (2000) A survey of seed and seedling characters in 1744 Australian dicotyledon species: cross-species trait correlations and correlated trait-shifts within evolutionary lineages. *Biological Journal of the Linnean Society. Linnean Society of London* **69**, 521–547. doi:10.1111/j.1095-8312.2000.tb01222.x
- Wright IJ, Westoby M, Reich PB (2002) Convergence towards higher leaf mass per area in dry and nutrient-poor habitats has different consequences for leaf life span. *Journal of Ecology* **90**, 534–543. doi:10.1046/j.1365-2745.2002.00689.x
- Wright IJ, Reich PB, *et al.* (2004) The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* **428**, 821–827. doi:10.1038/nature02403
- Wright IJ, Falster DS, Pickup M, Westoby M (2006) Cross-species patterns in the coordination between leaf and stem traits, and their implications for plant hydraulics. *Physiologia Plantarum* **127**, 445–456. doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00699.x
- Wright IJ, Ackerly D, *et al.* (2007) Relationships among ecologically important dimensions of plant trait variation in seven neotropical forests. *Annals of Botany* **99**, 1003–1015. doi:10.1093/aob/mcl066
- Yeo AR (1983) Salinity resistance: physiologies and prices. *Physiologia Plantarum* **58**, 214–222. doi:10.1111/j.1399-3054.1983.tb04172.x
- Zanne AE, Chapman CA, Kitajima K (2005) Evolutionary and ecological correlates of early seedling morphology in east African trees and shrubs. *American Journal of Botany* **92**, 972–978. doi:10.3732/ajb.92.6.972
- Zanne AE, Westoby M, Falster DS, Ackerly DD, Loarie SR, Arnold SEJ, Coomes DA (2010) Angiosperm wood structure: global patterns in vessel anatomy and their relation to wood density and potential conductivity. *American Journal of Botany* **97**, 207–215. doi:10.3732/ajb.0900178
- Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* **6**, 66–71. doi:10.1016/S1360-1385(00)01838-0
- Zimmermann MH, Jeje AA (1981) Vessel-length distribution in stems of some American woody plants. *Canadian Journal of Botany* **59**, 1882–1892. doi:10.1139/b81-248
- Zinke PJ (1962) The pattern of influence of individual forest trees on soil properties. *Ecology* **43**, 130–133. doi:10.2307/1932049
- Zotz G, Ziegler H (1997) The occurrence of crassulacean metabolism among vascular epiphytes from central Panama. *New Phytologist* **137**, 223–229. doi:10.1046/j.1469-8137.1997.00800.x
- Zwieniecki MA, Melcher PJ, Holbrook NM (2001) Hydrogel control of xylem hydraulic resistance in plants. *Science* **291**, 1059–1062. doi:10.1126/science.1057175
- Zwieniecki MA, Melcher PJ, Boyce CK, Sack L, Holbrook NM (2002) Hydraulic architecture of leaf venation in *Laurus nobilis* L. *Plant, Cell & Environment* **25**, 1445–1450. doi:10.1046/j.1365-3040.2002.00922.x

Apéndice 1. Resumen de todos los caracteres incluidos en este manual.

El rango de valores presentado en esta tabla corresponde a aquellos que pueden encontrarse en estudios de campo. Estos rangos de valores están basados en estudios extraídos de la literatura así como en las bases de datos de los autores del manual. Debido a esas razones los valores presentados no necesariamente corresponden a los rangos más amplios que es posible encontrar en la naturaleza o que son posibles teóricamente. El número de réplicas recomendado indica un número mínimo y un número preferido, de manera de obtener una indicación apropiada de los valores del carácter de interés. Cuando solo se indica un valor, éste corresponde al número de individuos (=réplicas); cuando se indican dos valores, el primero corresponde al número de individuos y el segundo al número de órganos que serán medidos por individuo (e.g. hojas). Debe notarse que una réplica puede estar compuesta por varios individuos (en especies de pequeño tamaño), pero un individuo no puede ser usado para diferentes réplicas. El rango de CV (coeficiente de variación) indicado corresponde a los percentilos 20° y 80° del coeficiente de variación (=desvío estándar dividido por la media) según se ha observado a lo largo de distintas bases de datos en un rango amplio de floras de distintos biomas.

	Unidades más comúnmente usadas	Rango de valores	Número de réplicas recomendado		Rango de CV (%)
			mínimo	preferido	
2. Caracteres de planta					
2.1. Historia de vida y longevidad máxima	categórico	-	3	5	-
2.2. Forma de vida	categórico	-	3	5	-
2.3. Forma de crecimiento	categórico	-	3	5	-
2.4. Altura de la planta	m	< 0,01 - 140	10	25	17-36
2.5. Clonalidad	categórico	-	5	10	-
2.6. Espinosidad			5	10	-
- Largo de espinas	mm	0,5 - 300			
- Ancho de espinas	mm	0,5 - 30			
- Relación largo espina:largo hoja	sin unidad	0 - 30			
2.7. Arquitectura de la planta	n° ramificaciones por rama	0 - > 100	5	10	-
2.8. Relación área de hoja:área de albura	sin unidad	100 - 10 ³	5	10	-
2.9. Fracción de biomasa de raíces	sin unidad	0,15 - 0,40 (para plántulas abajo de 0,10)	5	10	-
2.10. Resistencia a la salinidad			5	10	
- Absorción radicular selectiva de cationes	sin unidad	-			-
- Excreción de sal y compartimentalización	categórico	-			-
2.11. Tasa relativa de crecimiento	mg g ⁻¹ día ⁻¹	2 - 300	10	20	
2.12. Inflamabilidad de plantas	sin unidad	0 ~ 3	5	10	
2.13. Caracteres relacionados al uso del agua			10	20	
- Apertura de la copa	sin unidad	0 - 1			
- Flujo caulinar	%	0 - 50			
- Retención de agua sobre las superficies de la planta	g m ⁻²	0 - 500			
- Mojabilidad de la hoja	grados (ángulo de contacto)	0 - 180			
- Capacidad de retención de gotas	grados (ángulo de la pendiente)	0 - 90			

Apéndice 1. (continuación)

	Unidades más comúnmente usadas	Rango de valores	Número de réplicas recomendado		Rango de CV (%)
			mínimo	preferido	
3. Caracteres de hoja					
3.1. Área foliar específica	$\text{m}^2 \text{kg}^{-1} (\text{mm}^2 \text{mg}^{-1})^A$	<1–300	5; 5	10; 4	8–16
3.2. Área foliar	mm^2	1–>20 ⁶	5; 5	10; 4	17–36
3.3. Contenido de materia seca foliar	mg g^{-1}	50–700	5; 5	10; 4	4–10
3.4. Espesor foliar	mm	<0.1–5 ^B	5	10	
3.5. pH de hojas verdes o de la hojarasca	sin unidad	3.5–6.5	5; 5	10; 4	1–6
3.6. Concentración de nitrógeno y fósforo foliar					
a) Concentración de nitrógeno foliar	mg g^{-1}	5–70	5; 5	10; 4	8–19
b) Concentración de fósforo foliar	mg g^{-1}	0.2–5	5; 5	10; 4	10–28
3.7. Resistencia física de las hojas			5; 5	10; 4	14–29
- Fuerza para rasgar	N mm^{-1}	0.17–40			
- Trabajo para cortar	J m^{-1}	0.02–0.5			
- Fuerza para perforar	N mm^{-1}	0.03–1.6			
3.8. Longevidad y duración del follaje verde					
a) Longevidad de la hoja	meses	0.5–200	5; 40	10; 160	11–39
b) Duración del follaje verde	meses	1–12	5	10	–
3.9. Densidad de nervaduras	mm mm^{-2}	0.5–25	5	10	
3.10. Tasa fotosintética en saturación de luz	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	2–30	5	10	
3.11. Respiración foliar en oscuridad	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	0.4–4	5	10	
3.12. Vía metabólica fotosintética	categórico	–	3	3	–
3.13. Composición de isótopos de carbono como medida de la eficiencia intrínseca en el uso de agua	‰	–35––10	5	10	2–10
3.14. Pérdida de electrolitos	%	2–100	5; 5	10; 4	9–26
3.15. Potencial hídrico foliar	MPa	–7 → 0	5; 5	5; 10	11–33
3.16. Palatabilidad de hojas	% de área foliar consumida	0–100	10	20	
3.17. Descomponibilidad de broza	% pérdida de peso seco	0–100	10	20	7–14
4. Caracteres de tallo					
4.1. Densidad del tallo	$\text{mg mm}^{-3} (\text{kg l}^{-1})^A$	0.1–1.3	5	10	5–9
4.2. Contenido de materia seca de ramas terminales	mg g^{-1}	150–850	5	10	2–8
4.3. Espesor de corteza	mm	0.1–>30	5	10	
4.4. Conductividad del xilema					
- conductividad hidráulica específica del tallo (K_S)	$\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$	K_S : 1 (gimnospermas) hasta 200 (lianas tropicales);	5	10	21–63
- conductividad hidráulica específica foliar (K_L)	$\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$	K_L : 6×10^{-5} (gimnospermas) hasta 1×10^{-2} (lianas tropicales)			
4.5. Vulnerabilidad al embolismo (ψ_{50})	MPa	–0.25–14	5	10	20–45

Apéndice 1. (continuación)

	Unidades más comúnmente usadas	Rango de valores	Número de réplicas recomendado		Rango de CV (%)
			mínimo	preferido	
5. Caracteres de raíces					
5.1. Longitud específica de la raíz	m g ⁻¹	3 – 350	5, 10	10, 10	15 – 24
5.2. Morfología del sistema radical			5	10	
- Profundidad	m	0.05 – 70			
- Extensión lateral	m	0.05 – 40			
- Intensidad de exploración	mm mm ⁻³	10 ⁻⁴ – 1			
5.3. Estrategia de absorción de nutrientes	categorico	–	5	10	–
6. Caracteres regenerativos					
6.1. Síndrome de dispersión	categorico	–	3	6	–
6.2. Tamaño y forma del propágulo					
- Tamaño (masa)	mg o g		5	10	
- Forma	sin unidad	0 – 1	3	6	–
6.3. Potencial de dispersión	dispérsulos dispersados / dispérsulos producidos	–	10	20	–
6.4. Masa de la semilla	mg	10 ⁻³ – 10 ⁷	5	10	14 – 27
6.5. Morfología funcional de la plántula	categorico	–	3	6	–
6.6. Capacidad de rebrote	sin unidad	0 – 100	5	10	–

^A Entre paréntesis se indican las unidades preferidas alternativas.

^B Solo se considera el tejido fotosintético; el espesor de hoja total puede ser mayor a 40 mm en algunas especies suculentas.

^C Los números de réplicas corresponden a los números de plantas individuales (réplicas) de las cuales recoger la hojarasca o broza; el número de hojas dentro de cada muestra dependerá de su peso y del tamaño de la bolsa de descomposición.