

# Mecanismos fisiológicos de respuesta de la cebada al impacto de la sequía y el elevado CO<sub>2</sub> –ADAPTACIÓN AL CAMBIO CLIMÁTICO–

TESIS DOCTORAL

ANABEL ROBREDO RUIZ DE AZUA



eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología

LEIOA,  
2011



**MECANISMOS FISIOLÓGICOS DE RESPUESTA DE LA CEBADA**  
**AL IMPACTO DE LA SEQUÍA Y EL ELEVADO CO<sub>2</sub>**  
***-ADAPTACIÓN AL CAMBIO CLIMÁTICO-***

Memoria presentada por Anabel Robredo Ruiz de Azua para optar al Grado de Doctor  
en Ciencias

Anabel Robredo Ruiz de Azua

Leioa, Junio 2011



**ACTA DE GRADO DE DOCTOR**  
**ACTA DE DEFENSA DE TESIS DOCTORAL**

DOCTORANDO DON/ÑA. **Anabel Robredo Ruiz de Azua**  
TITULO DE LA TESIS: **Mecanismos fisiológicos de respuesta de la cebada al  
impacto de la sequía y el elevado CO<sub>2</sub>: Adaptación al cambio climático.**

El Tribunal designado por la Subcomisión de Doctorado de la UPV/EHU para calificar la Tesis Doctoral arriba indicada y reunido en el día de la fecha, una vez efectuada la defensa por el doctorando y contestadas las objeciones y/o sugerencias que se le han formulado, ha otorgado por \_\_\_\_\_ la calificación de:  
*unanimidad ó mayoría*

En \_\_\_\_\_ a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

EL/LA PRESIDENTE/A,

EL/LA SECRETARIO/A,

Fdo.:

Fdo.:

Dr/a: \_\_\_\_\_

Dr/a: \_\_\_\_\_

VOCAL 1º,

VOCAL 2º,

VOCAL 3º,

Fdo.:

Fdo.:

Fdo.:

Dr/a: \_\_\_\_\_ Dr/a: \_\_\_\_\_ Dr/a: \_\_\_\_\_

EL/LA DOCTORANDO/A,

Fdo.: \_\_



Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores Alberto Muñoz Rueda y Amaia Mena Petite por las constantes enseñanzas que de ellos he recibido, así como por su inestimable apoyo. Gracias Alberto y Amaia por haber sacrificado tantas horas de vuestro trabajo conmigo, por lo que me habéis enseñado. Gracias por darme esta oportunidad, porque han sido una detrás de otra, por confiar en mí y por animarme a llegar hasta aquí. El trabajo ha merecido realmente la pena.

Agradezco al Laboratorio de Fisiología Vegetal la posibilidad de completar mi formación asistiendo a congresos, cursos y seminarios. He aprendido en todos ellos.

Os agradezco, de veras, a TODOS los del laboratorio por todo lo que me habéis enseñado. Desde que comencé como alumna interna, con cada duda que me habéis aclarado y con todos los consejos que me habéis dado, me he formado como fisiólogo vegetal y además como persona.

A Carmen González Murua, Txema Becerril, Nacho García Plazaola, Antonio Hernández y Maite Lacuesta por ayudarme en todo lo que he necesitado, muchas gracias.

A Miren Duñabeitia, dicen que los humanos somos egoístas por naturaleza; tú no debes ser humana, Miren a ti te debo mucho, mucho, por ejemplo, continuar por el camino del laboratorio sabiendo que no todo iba a ser fácil y que cuesta que las cosas salgan bien. Gracias por ayudarme en los innumerables aspectos, que al final compartimos, gracias en todos los sentidos.

Txema Estavillo y Bego González , gracias por todo lo que me habeis ayudado y enseñado, por haberme transmitido el entusiasmo enzimático (sobre todo del nitrógeno). Siempre nos quedará París...

Héctor, cuando comencé con la tesis eras mi ejemplo a seguir, gracias por todas las orientaciones que me diste, siempre con una buena explicación de porqué se hacen las cosas de una forma y no de otra.

A la gente de Botánica, con la que también colaboré; especialmente, a Isabel Salcedo y Esti Sarrionandia, muchas gracias por haber contado conmigo para el trabajo de Urdaibai, con el que disfruté y aprendí tanto. A Antonio Secilla, porque nos ayudó un montón con la portada y sin cuya mano no hubiera quedado tan bonita, el que sabe, sabe, muchas gracias.

Al equipo del estabulario de la uni, muchas gracias por lo que me enseñasteis, y por lo que compartisteis conmigo, especialmente a Almu Ramos y Maite Fuentes. También a Santiago Larregla, de Neiker-Derio, por confiar en mí, donde hicimos unos buenos y duros trabajos, muchas gracias, especialmente a Mireia Nuñez.

A Miren Duñabeitia por la oportunidad que me diste para trabajar en tu línea de investigación, forestal y micológica, junto a Unai Ortega, Joseba Sánchez, Kepa Txarterina y Orats Arana con los que trabajé con mucho entusiasmo en otros campos de la fisiología vegetal.

A toda la “cuadrilla” del labo: especialmente a Teresa, Unai Artetxe, Unai Ortega, Oihana y Sergio. Nos queda una bonita amistad. Al final somos los “jóvenes” que vinimos del labo viejo, de la “transición”, empezamos juntos hace tiempo y seguimos aquí, sois un punto de referencia para mí, siento que he aprendido de vosotros y con vosotros. Hemos pasado también buenas celebraciones en el laboratorio y fuera de él, las añoro... puedo asegurar que entre todos conseguimos que en el laboratorio se respirara un ambiente superagradable, de mucha colaboración y organización, siempre pudimos arreglárnoslas “sin jefes” a la hora de distribuir tareas, “rollos y movidas”, etc., bueno, siempre con la ayuda de nuestro Antonio.

A Raquel, Joseba, Bea, Igor, Ernesto, María, Iskander, Maite, Ximena, Izargi, Iñigo y Ernesto (de Vitoria), muchas gracias a todos. A David y, especialmente, a Jon Miranda, la promesa del grupo, espero que trabajemos mucho juntos y que te pueda ayudar tanto como me han ayudado a mí, mucha suerte.

A los que han pasado por el labo, con los que compartí muy buenos momentos, me ayudasteis como compañeros y algunos, como alumnos internos o de master (Laura, Sonia, Xana, Koldo, Lichy, Nausica, Saioa, Erika, Angela y Alaitz).

Amaia, muchas gracias por tus buenos consejos, por hacerme ver las cosas desde otro punto de vista, por tus correcciones siempre acertadas y constructivas, por esos buenos momentos que hemos pasado dentro y fuera del labo. Espero que nuestra amistad siga y siga durante mucho tiempo. Y que las “pringle taldea” vuelvan a la carga...

Azu, Teresa y Raquel, muchas gracias por ayudarme en todo lo que me habéis ayudado, por confiar en mí y contar conmigo. Por esos descansitos de café tan valiosos. Por el intercambio de consejos y trucos de amatxus... Por esa amistad que venimos cultivando...

Usue, gracias por transmitirme esa energía positiva que ¡Dios mío! ¿de dónde la sacas? Fue una suerte conocerte y que me ayudes, fue como si me hubiera tocado la lotería, eres todo un ejemplo a seguir, un gran pilar. Muchísimas, muchísimas gracias por todo.

Especialmente a Nere que fue con quien empecé en el laboratorio, sabes que eres muy especial para mí. Me has enseñado tantas cosas que no se pueden escribir ni aquí ni ahora... Hemos compartido tantos momentos, ha sido una suerte para mí que me dieras la oportunidad de conocer este mundo, de veras, mil gracias.

A mis amigas de la uni: Edurne, Gema, Noemi, Maite y Virginia, fue una suerte que nos conociéramos, hicimos un bonito talde de amigas, del que además he aprendido mucho. Muchas gracias por estar dispuestas siempre a compartir momentos buenos y lo que haga falta.

A TOD@S mis amig@s de aquí y de allá, Sara, Amaia de la Fuente, Ane, Keltse, Almudena, Mertxe, Bego, Saioa, Mikeltxo (y demás fauna del parque), especialmente a Sara, por tu amistad y comprensión, por todos estos años que van pasando y nos van enseñando tanto, por ser como eres y para que no cambies nunca.

A toda mi FAMILIA (también la política), por su apoyo, por haberme dado la oportunidad de hacer tantas cosas. Por los buenos consejos y toda la ayuda que me habéis prestado siempre y, especialmente, en este último año. No tengo palabras para describir la suerte que tengo con todos vosotros. Muchísimas gracias, especialmente a mi padre, mi madre, mi hermano y mi hermana.

A Pedro, gracias por caminar junto a mí, por entenderme, por escucharme, por darme otra manera de ver las cosas, menos pasionales y más razonables, por tu esfuerzo en entender en qué consisten mis experimentos, porque parece cosa de extraterrestres, por todo el tiempo que te he hecho esperar. Gracias por lo que hemos aprendido juntos, por lo que compartimos, por esa familia que hemos creado que es nuestro mayor tesoro, Telmo y Martín, nuestros amores, mi amor.





Quisiera agradecer al Laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología Vegetal y Ecología, especialmente a mis directores de tesis, el Dr. Alberto Muñoz Rueda y la Dra. Amaia Mena Petite por darme la oportunidad de realizar este trabajo.

Así mismo, me gustaría dar las gracias al Gobierno Vasco por concederme la beca predoctoral para la formación de Investigadores del Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco.

Por otro lado, agradezco a las siguientes entidades que han permitido la realización de este trabajo:

- Ministerio de Educación y Ciencia: MEC (DGESIC) PB1998-0148, BFI 2001-03391.
- Gobierno Vasco: GV PI-1999-52, K-EGOKITZEN; Grupo de investigación IT 326-10.
- Universidad del País Vasco (UPV/EHU): UPV 118.310-G07/2001, Cátedra UNESCO 07/02, UPV GIU 07/43.

Por último, debo hacer mención también a las siguientes entidades promotoras observadoras (EPO): EHNE, Factor CO<sub>2</sub>, Guascor, IHOBE, Petronor, Sener e IZAITE, por el interés mostrado en nuestras líneas de investigación.



*A todos los que formáis parte de mí...*



*En ausencia de un conocimiento científico suficiente al salir del sistema educativo, es de importancia capital que la información y la divulgación compensen los déficits formativos en el ámbito científico. Ello proporcionará a la ciudadanía elementos de enriquecimiento cultural muy importantes, pero, además, la divulgación social de la ciencia y la tecnología ejercerá otra función fundamental, la de reafirmar los fundamentos de nuestra sociedad, de su carácter abierto, libre y democrático. O, expresado con menos palabras: el conocimiento -y en este caso el conocimiento científico- nos hace más libres.*



## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

|                 |  |
|-----------------|--|
| <i>A</i>        | Asimilación neta de CO <sub>2</sub>                |
| <i>A/Ci</i>     | Curvas de respuesta al CO <sub>2</sub> externo     |
| <i>A/PPDF</i>   | Curvas de respuesta a la luz                       |
| ABA             | Ácido abscísico                                    |
| <i>Amax,Ci</i>  | Tasa de asimilación máxima (curvas <i>A/Ci</i> )   |
| <i>Amax,luz</i> | Tasa de asimilación máxima (curvas <i>A/PPDF</i> ) |
| AO              | Ajuste osmótico                                    |
| ATP             | Adenosín trifosfato                                |
| C <sub>24</sub> | Conductividad electrolítica a las 24 horas         |
| <i>Ca</i>       | Concentración externa de CO <sub>2</sub>           |
| CAT             | Ciclo de los ácidos tricarboxílicos                |
| <i>CE</i>       | Eficiencia de carboxilación                        |
| <i>Ci</i>       | Concentración interna de CO <sub>2</sub>           |
| C <sub>o</sub>  | Conductividad electrolítica del agua desionizada   |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de carbono                                 |
| C <sub>T</sub>  | Conductividad electrolítica total                  |
| CH              | Conductancia hidráulica                            |
| Chl             | Clorofila  |
| CHR             | Contenido hídrico relativo foliar                  |
| CHRS            | Contenido hídrico relativo del suelo               |
| D0              | Día 0 del experimento                              |
| D13             | Día 13 del experimento                             |
| D16             | Día 16 del experimento                             |
| D9              | Día 9 del experimento                              |
| DMSO            | Dimetil sulfóxido                                  |
| DTT             | DL-ditiotreitol                                    |
| <i>E</i>        | Transpiración instantánea                          |
| EDTA            | Ácido <i>N,N,N,N</i> -etilen diamino tetracético   |
| <i>ETR</i>      | Tasa de transporte electrónico                     |



|                       |  |
|-----------------------|--|
| <i>EUA</i>            | Eficiencia en el uso del agua por planta entera                          |
| FAD                   | Flavinamida adenín dinucleótido oxidado                                  |
| Fm                    | Fluorescencia máxima en plantas adaptadas a la oscuridad                 |
| Fms                   | Fluorescencia máxima a la luz  |
| Fo                    | Fluorescencia inicial en plantas adaptadas a la oscuridad                |
| Fod                   | Fluorescencia mínima en plantas adaptadas a la luz                       |
| Fs                    | Fluorescencia basal en plantas adaptadas a la luz                        |
| Fv                    | Fluorescencia variable   |
| <i>Fv/Fm</i>          | Eficiencia máxima del fotosistema II en plantas adaptadas a la oscuridad |
| <i>F'v/F'm</i>        | Eficiencia máxima del fotosistema II en plantas adaptadas a la luz       |
| GaAsP                 | Fosforo de galio y arsénico  |
| GDH                   | Glutamato Deshidrogenasa   |
| GDH-NADH              | Glutamato Deshidrogenasa en sentido aminante                             |
| GDH-NAD               | Glutamato Deshidrogenasa en sentido desaminante                          |
| $\gamma$ -GHM         | $\gamma$ -glutamil hidroxamato   |
| gln                   | Glutamina  |
| glu                   | Glutamato  |
| <i>gm</i>             | Conductancia del mesófilo  |
| GOGAT                 | Glutamato Sintasa  |
| <i>gs</i>             | Conductancia estomática  |
| GS                    | Glutamina Sintetasa  |
| HC                    | Conductancia hidráulica  |
| HEPES                 | Ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfónico)           |
| HR                    | Humedad Relativa   |
| <i>ITE</i>            | Eficiencia instantánea en el uso del agua ( <i>A/E</i> )                 |
| <i>Jc</i>             | Proporción de electrones que se destinan a carboxilación                 |
| <i>Jmax</i>           | Tasa máxima de transporte electrónico                                    |
| <i>Jo</i>             | Proporción de electrones que se destinan a oxigenación                   |
| <i>Jt</i>             | Flujo total de electrones (=ETR)   |
| LAR                   | Relación de área foliar  |
| <i>Lm</i>             | Limitación del mesófilo a la difusión del CO <sub>2</sub>                |
| <i>Ls</i>             | Limitación impuesta por los estomas al paso del CO <sub>2</sub>          |
| LWR                   | Relación de peso foliar  |
| Na <sub>2</sub> .EDTA | Ácido etilendiamino tetraacetato disódico                                |

|                     |   |
|---------------------|---|
| NAD                 | Nicotinamida adenín dinucleótido oxidado                                      |
| NADH                | Nicotinamida adenín dinucleótido reducido                                     |
| NaGlu               | Glutamato de sodio  |
| NAR                 | Tasa de asimilación neta  |
| NNED                | N-naftil-l-etilendiaminoclorohidrato  |
| <i>NPQ</i>          | <i>Quenching</i> no fotoquímico (calculado sin tener en cuenta el Fo)         |
| NRasa               | Nitrato Reductasa   |
| NR-EDTA             | Actividad máxima de la Nitrato Reductasa <i>in vitro</i>                      |
| NR-Mg <sup>2+</sup> | Actividad real de la Nitrato Reductasa <i>in vitro</i>                        |
| 2-OG                | 2-oxoglutarato  |
| PAR                 | Radiación fotosintéticamente activa   |
| PF                  | Peso fresco   |
| PF/PS               | Relación entre peso fresco y peso seco  |
| PFis                | Peso fresco del suelo del control al inicio del experimento                   |
| PFs                 | Peso fresco del suelo   |
| PMS                 | Metosulfato de fenacina   |
| PMSF                | Fenilmetilsulfonil fluoruro   |
| <i>Pn</i>           | Fotosíntesis neta   |
| ppm                 | Partes por millón   |
| PS                  | Peso seco   |
| PSII                | Fotosistema II  |
| PSL                 | Punto de saturación luminosa de la fotosíntesis                               |
| PSs                 | Peso seco del suelo   |
| PT                  | Peso turgente   |
| PVPP                | Polivinil polipirrolidona   |
| qE                  | Energía pH dependiente  |
| <i>qNP</i>          | <i>Quenching</i> no fotoquímico   |
| <i>qP</i>           | <i>Quenching</i> fotoquímico  |
| <i>Quenching</i>    | Procesos amortiguadores de la fluorescencia disipadores del exceso de energía |
| R1                  | Recuperación durante 7 días tras la sequía de 9 días                          |
| R2                  | Recuperación durante 3 días tras la sequía de 13 días                         |
| <i>Rd</i>           | Tasa de respiración a la oscuridad  |
| RGR                 | Tasa de crecimiento relativo  |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <i>Rl</i>               | Respiración mitocondrial a la luz por unidad de área foliar |
| RML                     | Resistencia mesofílica relativa                             |
| <i>RQ</i>               | Requerimiento cuántico                                      |
| RSL                     | Resistencia estomática relativa                             |
| RuBP                    | Ribulosa-1,5-bisfosfato                                     |
| S13                     | Sequía de 13 días   |
| S16                     | Sequía de 16 días   |
| S9                      | Sequía de 9 días  |
| SLA                     | Área específica foliar                                      |
| <i>T</i>                | Transpiración por planta entera                             |
| TCA                     | Ácido tricloroacético                                       |
| TPU                     | Utilización de las triosas fosfato                          |
| Tris                    | Tampón Tris-(hidroximetil)aminometano                       |
| <i>V<sub>cmax</sub></i> | Tasa máxima de carboxilación                                |
| ANOVA                   | Análisis de la varianza                                     |
| $\Psi_o$                | Potencial osmótico  |
| $\Psi_o^{100}$          | Potencial osmótico a máxima turgencia                       |
| $\Delta\Psi_o^{100}$    | Ajuste osmótico a máxima turgencia                          |
| $\Psi_p$                | Potencial de presión  |
| $\Psi_{w_{md}}$         | Potencial hídrico al mediodía                               |
| $\Psi_{w_{pd}}$         | Potencial hídrico al amanecer                               |
| $\phi$                  | Rendimiento cuántico  |
| $\Phi_{CO_2}$           | Eficiencia cuántica aparente                                |
| $\Phi_{PSII}$           | Eficiencia fotoquímica del fotosistema II                   |
| $\Gamma_{CO_2}$         | Punto de compensación del CO <sub>2</sub>                   |
| $\Gamma_{Luz}$          | Punto de compensación de la luz                             |

## Resumen

El ser humano está modificando a velocidad creciente la distribución espacial y el funcionamiento de los ecosistemas. Dicha modificación tiene lugar a escala local, regional y global de forma que hoy en día la gran mayoría de los ecosistemas terrestres presentan un cierto grado de degradación atribuible a las actividades humanas. Además, estas actividades están cambiando las características de la atmósfera y el clima, dando lugar a un cambio climático global.

Según las últimas predicciones, la concentración de CO<sub>2</sub> atmosférica llegará a ser cercana a 700 μmol mol<sup>-1</sup> a finales del siglo XXI. Además del incremento del CO<sub>2</sub>, se predice que otras consecuencias del cambio climático podrían ser temperaturas más elevadas, mayor sequía y salinización de los suelos, entre otras. Las predicciones sobre el cambio climático apuntan hacia un aumento de la duración e intensidad de las sequías durante el s. XXI, asociadas con un régimen más irregular de las precipitaciones y con temperaturas más extremas y en general más cálidas. Tales cambios en la concentración de CO<sub>2</sub> y en la disponibilidad hídrica afectan a varios procesos fisiológicos en las plantas.

La sequía es, sin duda, la condición ambiental a que más frecuentemente se ven sometidas las plantas. La disponibilidad hídrica es un factor crítico para evaluar los efectos del cambio climático sobre la mayoría de los ecosistemas terrestres. Sin embargo, también hay que tener en cuenta la respuesta positiva al aumento de CO<sub>2</sub> atmosférico, que puede aliviar parcialmente el efecto negativo del aumento de sequía frente a la productividad.

La sequía limita la asimilación de C y N, así como el crecimiento. Además ejerce una gran influencia en la dinámica de nutrientes ya que el calentamiento aumenta la mineralización, y la sequía impide el uso de nutrientes por parte de las plantas y facilita su pérdida en el sistema cuando llegan las lluvias. Se trata pues de una situación en la que la sequía y la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub> ejercen efectos que pueden ser antagónicos sobre la fisiología de los cultivos.

Se espera que el aumento de la concentración de CO<sub>2</sub> tenga un impacto considerable en la vegetación a través de cambios en la fotosíntesis y otros procesos fisiológicos. En general, una [CO<sub>2</sub>] elevada aumenta la biomasa, el crecimiento de las raíces y el área total de las hojas, y altera las tasas de fotosíntesis neta, la conductancia

estomática y la eficiencia en el uso del agua. No obstante, la magnitud de tales respuestas depende de la disponibilidad de otros recursos que pueden ser limitantes. De esta manera, la disponibilidad de nitrógeno del suelo, la temperatura o la luz pueden afectar a dichas respuestas. Sin embargo, el factor más limitante para la productividad de los ecosistemas terrestres es el agua; de ese modo, el análisis de la interacción entre la elevada  $[\text{CO}_2]$  y el agua del suelo es de capital relevancia para la comprensión de la respuesta de las plantas frente al cambio ambiental.

La cebada es uno de los cereales más cultivados del mundo y se ha documentado que su productividad podría aumentar hasta un 0,35% por ppm de  $\text{CO}_2$  incrementado. Su cultivo es generalizado en la península ibérica y parece ser, de entre los cereales de clima templado, el mejor adaptado a la restricción hídrica. Al mismo tiempo, se ha considerado que un aumento del  $\text{CO}_2$  atmosférico puede mitigar los efectos de otros estreses ambientales.

Por ello, nuestro objetivo general ha sido analizar el efecto combinado del enriquecimiento de  $\text{CO}_2$  y el estrés hídrico durante la imposición progresiva de sequía, cuantificando las respuestas fisiológicas en cebada tanto desde el punto de vista de las relaciones hídricas como del intercambio gaseoso, así como la fotoquímica de la fotosíntesis, la asimilación de N y el crecimiento vegetal, analizando, además, la capacidad de la cebada para recuperarse del estrés hídrico, tanto bajo las condiciones de la atmósfera actual ( $350 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ), como con la perspectiva de mayores niveles de  $\text{CO}_2$  ( $700 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ).

Nuestros resultados muestran que plantas de cebada creciendo en riego y elevada  $[\text{CO}_2]$  presentan un estado hídrico similar al de plantas crecidas en riego y  $[\text{CO}_2]$  ambiental. En cambio, a nivel fotosintético se observa en dichas plantas mayor asimilación de C y menor pérdida de agua por transpiración, mayor asimilación de N y mayor contenido de proteína soluble y de pigmentos que las plantas crecidas en riego y  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Por otro lado, la sequía afecta negativamente a la cebada en todos los parámetros hídricos analizados. Además, la sequía incide directamente sobre la fotosíntesis, la asimilación de N, así como sobre los niveles de proteínas y pigmentos fotosintéticos. También se ha observado que la falta de agua induce un descenso en el crecimiento disminuyendo el número de hojas, el área foliar y, en último término, la producción de biomasa total modificando las respuestas de las tasas de crecimiento relativo. Al analizar el efecto combinado de la sequía en plantas crecidas bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  se ha observado menor efecto de la sequía en la respuesta fisiológica de la planta

que en plantas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental. El contenido hídrico tanto del suelo como de la planta descienden menos, las tasas de fotosíntesis se mantienen durante más tiempo, la asimilación de N se ve menos afectada y el crecimiento es más elevado que en plantas de  $[\text{CO}_2]$  ambiental.

Por otro lado, al restablecer el riego en las plantas sometidas previamente a sequía se observa que en la mayoría de parámetros analizados el efecto de la sequía revierte bajo ambas  $[\text{CO}_2]$ . Todo ello pone de manifiesto que bajo las condiciones futuras de elevada  $[\text{CO}_2]$  la fisiología de la cebada se vería menos afectada por la sequía que en condiciones de  $\text{CO}_2$  ambiental, retrasando las repercusiones negativas de la falta de precipitaciones en el desarrollo de la planta que acompañan al cambio climático durante un periodo de tiempo más prolongado.



## ÍNDICE GENERAL

|   |   |
|---|---|
| <b>1. <u>INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS</u></b>   |   |
| <b><u>GENERALES</u></b> .....   | 1 |
| <br>  |   |
| <b>1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....  | 3 |
| <br>  |   |
| <b>1.1.1. EFECTO DE LA SEQUÍA</b> .....   | 3 |
| <br>  |   |
| <b>1.1.2. EFECTO DE LA ELEVADA [CO<sub>2</sub>] Y SU INTERACCIÓN CON OTROS ESTRESSES COMO LA SEQUÍA</b> ..... | 5 |
| <br>  |   |
| <b>1.2. INTERÉS Y OBJETIVOS GENERALES</b> .....   | 6 |



|   |    |
|---|----|
| <b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | 9  |
| <b>2.1. MATERIAL VEGETAL</b> .....  | 11 |
| <b>2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....   | 12 |
| 2.2.1. Condiciones de crecimiento.....  | 13 |
| 2.2.2. Imposición de la sequía y recuperación del estrés hídrico.....   | 13 |
| 2.2.3. Toma de muestras y congelación del material vegetal.....   | 14 |
| <b>2.3. RELACIONES HÍDRICAS</b> .....   | 14 |
| 2.3.1. Contenido hídrico relativo del suelo, CHRS.....  | 14 |
| 2.3.2. Contenido hídrico relativo foliar, CHR.....  | 15 |
| 2.3.3. Potencial hídrico foliar, $\Psi_{w_{pd}}$ , $\Psi_{w_{md}}$ .....  | 15 |
| 2.3.4. Potencial osmótico, $\Psi_o$ , potencial osmótico a máxima<br>turgencia, $\Psi_o^{100}$ y ajuste osmótico, AO..... | 16 |
| 2.3.5. Potencial de presión, $\Psi_p$ .....   | 17 |
| 2.3.6. Transpiración en planta entera, $T$ .....  | 17 |
| 2.3.7. Conductancia hidráulica, CH.....   | 17 |
| 2.3.8. Eficiencia en el uso del agua, $ITE$ .....   | 17 |
| 2.3.9. Conductividad electrolítica.....   | 18 |
| <b>2.4. ASIMILACIÓN DE CO<sub>2</sub></b> .....   | 18 |
| 2.4.1. Asimilación neta de CO <sub>2</sub> .....  | 19 |
| 2.4.2. Aclimatación.....  | 19 |
| 2.4.3. Rendimiento y requerimiento cuánticos.....   | 19 |
| 2.4.4. Curvas de respuesta a la [CO <sub>2</sub> ], $A/C_i$ .....   | 20 |
| 2.4.5. Curvas de respuesta a la luz, $A/PPDF$ .....   | 21 |
| <b>2.5. FLUORESCENCIA</b> .....   | 22 |
| <b>2.6. METABOLISMO DEL NITRÓGENO</b> .....   | 24 |
| 2.6.1. Actividad Nitrato Reductasa, NR.....   | 24 |
| 2.6.1.1. Extracción.....  | 24 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.6.1.2. Determinación de la actividad.....  | 24        |
| 2.6.2. Actividad Glutamina Sintetasa, GS.....  | 25        |
| 2.6.3. Actividad Glutamato Deshidrogenasa, GDH .....                                       | 26        |
| 2.6.3.1. Actividad GDH aminante: GDH- NADH .....   | 26        |
| 2.6.3.2. Actividad GDH desaminante: GDH-NAD <sup>+</sup> .....                             | 27        |
| <b>2.7. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>2.8. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS<br/>FOTOSINTÉTICOS.....</b>                | <b>28</b> |
| <b>2.9. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO.....</b>   | <b>28</b> |
| 2.9.1. Parámetros absolutos.....   | 28        |
| 2.9.2. Parámetros relativos.....   | 28        |
| <b>2.10. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....</b>  | <b>30</b> |
| <b><u>3. RELACIONES HÍDRICAS.....</u></b>  | <b>31</b> |
| <b>3.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>3.2. RESULTADOS.....</b>  | <b>35</b> |
| 3.2.1. Contenido hídrico relativo de suelo, CHRS y foliar, CHR.....                        | 35        |
| 3.2.2. Potencial hídrico, $\Psi_w$ , osmótico, $\Psi_o$ y de pared, $\Psi_p$ .....         | 37        |
| 3.2.3. Potencial osmótico a máxima turgencia, $\Psi_o^{100}$<br>y ajuste osmótico, AO..... | 42        |
| 3.2.4. Transpiración en planta entera, $T$ .....   | 42        |
| 3.2.5. Conductancia hidráulica, CH.....  | 43        |
| 3.2.6. Conductividad electrolítica.....  | 44        |
| <b>3.3. DISCUSIÓN.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>3.4. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>48</b> |

|   |     |
|---|-----|
| <b><u>4. PROCESOS FOTOSINTÉTICOS</u></b> .....  | 51  |
| <b>4.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b> .....  | 53  |
| <b>4.2. RESULTADOS</b> .....  | 57  |
| 4.2.1. Fotosíntesis.....  | 57  |
| 4.2.1.1. Conductancia estomática, <i>g<sub>s</sub></i> ,<br>asimilación, <i>A</i> , concentración interna de CO <sub>2</sub> , <i>C<sub>i</sub></i> y<br>transpiración instantánea, <i>E</i> . Eficiencia en el uso<br>del agua, <i>ITE</i> ..... | 57  |
| 4.2.1.2. Rendimiento fotosintético, $\phi$ y<br>requerimiento cuántico, <i>RQ</i> .....   | 65  |
| 4.2.1.3. Aclimatación.....  | 67  |
| 4.2.1.4. Curvas <i>A/C<sub>i</sub></i> .....  | 70  |
| 4.2.1.5. Curvas <i>A/PPDF</i> .....   | 73  |
| 4.2.2. Fluorescencia.....   | 76  |
| 4.2.3. Pigmentos fotosintéticos.....  | 79  |
| <b>4.3. DISCUSIÓN</b> .....   | 83  |
| 4.3.1. Intercambio gaseoso.....   | 83  |
| 4.3.2. Aclimatación al CO <sub>2</sub> .....  | 86  |
| 4.3.3. Curvas <i>A/C<sub>i</sub></i> .....  | 88  |
| 4.3.4. Curvas <i>A/PPDF</i> .....   | 92  |
| 4.3.5. Fluorescencia y pigmentos.....   | 93  |
| <b>4.4. CONCLUSIONES</b> .....  | 97  |
| <b><u>5. METABOLISMO DEL NITRÓGENO</u></b> .....  | 99  |
| <b>5.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b> .....  | 101 |
| <b>5.2. RESULTADOS</b> .....  | 105 |
| 5.2.1. Actividad nitrato reductasa, NR .....  | 105 |

|   |            |
|---|------------|
| 5.2.2. Actividad glutamina sintetasa, GS.....   | 110        |
| 5.2.3. Actividad, glutamato deshidrogenasa GDH.....                                       | 112        |
| 5.2.3.1. Actividad aminante, GDH-NADH.....  | 112        |
| 5.2.3.2. Actividad desaminante, GDH-NAD <sup>+</sup> .....                                | 113        |
| 5.2.4. Cuantificación de proteína soluble .....   | 115        |
| <b>5.3. DISCUSIÓN.....</b>  | <b>119</b> |
| 5.3.1. Reducción de nitrato.....  | 119        |
| 5.3.1.1. Efecto de la sequía a [CO <sub>2</sub> ] ambiental.....                          | 119        |
| 5.3.1.2. Efecto de la sequía a elevada [CO <sub>2</sub> ].....                            | 121        |
| 5.3.2. Asimilación de amonio.....   | 123        |
| 5.3.2.1. Glutamina sintetasa. Efecto de la sequía y de la<br>[CO <sub>2</sub> ].....      | 123        |
| 5.3.2.2. Glutamato deshidrogenasa. Efecto de la sequía y<br>de la [CO <sub>2</sub> ]..... | 125        |
| 5.3.3. Proteína soluble. Efecto de la sequía y de la [CO <sub>2</sub> ] .....             | 127        |
| <b>5.4. CONCLUSIONES.....</b>   | <b>129</b> |
| <b><u>6. CRECIMIENTO.....</u></b>   | <b>131</b> |
| <b>6.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....</b>  | <b>133</b> |
| <b>6.2. RESULTADOS .....</b>  | <b>135</b> |
| 6.2.1. Aspectos morfológicos del desarrollo.....  | 135        |
| 6.2.2. Parámetros absolutos.....  | 139        |
| 6.2.3. Parámetros relativos.....  | 149        |
| <b>6.3. DISCUSIÓN.....</b>  | <b>155</b> |
| 6.3.1. Parámetros absolutos.....  | 155        |
| 6.3.2. Parámetros relativos.....  | 161        |
| <b>6.4. CONCLUSIONES.....</b>   | <b>165</b> |

**7. DISCUSIÓN GENERAL.....167**

**8. BIBLIOGRAFÍA .....177**

# PRIMER CAPÍTULO

## INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS GENERALES

### **1.1. Introducción general**

#### **1.1.1. Efecto de la sequía**

#### **1.1.2. Efecto de la elevada [CO<sub>2</sub>] y su interacción con otros estreses como la sequía**

### **1.2. Interés y objetivos generales**



## 1.1. Introducción general

El ser humano está modificando a velocidad creciente la distribución espacial y el funcionamiento de los ecosistemas. Dicha modificación tiene lugar a escala local, regional y global de forma que hoy en día la gran mayoría de los ecosistemas terrestres presentan un cierto grado de degradación o alteración atribuible a las actividades humanas (Vitousek et al., 1997). Además, estas actividades están cambiando las propiedades físicas de la atmósfera y el clima, dando lugar a un cambio climático general. Al mismo tiempo, hay evidencias irrefutables de que los ecosistemas están respondiendo a todos estos cambios (Hulme et al., 1999; Hughes, 2000). Aunque muchas de estas evidencias se apoyan en respuestas de especies particularmente sensibles, hay cada vez más resultados que muestran efectos a nivel de todo el ecosistema. Si bien dichos efectos no son apreciables fácilmente, tienen en general un plazo temporal de varias décadas y se ven con frecuencia influidos por las condiciones locales (Vitousek et al., 1997; Parmesan y Yohe, 2003).

Según las últimas predicciones, parece que la concentración de CO<sub>2</sub> atmosférica llegará a ser cercana a 700  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  a finales de este siglo (Fangmeier et al., 2000). Además del incremento del CO<sub>2</sub> se predice que otras consecuencias del cambio climático podrían ser temperaturas más elevadas, mayor sequía y estrés por exceso de luz. Dichos cambios en la concentración de CO<sub>2</sub> y en la disponibilidad hídrica afectan a muy diversos procesos fisiológicos en las plantas (Tezara et al., 2002), como pondremos de manifiesto en esta Tesis.

### 1.1.1. Efecto de la sequía

La sequía es, sin duda, la condición ambiental transitoria y extrema a que más frecuentemente se ven sometidas las plantas. Sin embargo, las plantas han desarrollado múltiples mecanismos de defensa contra la desecación (Barceló et al., 1992). La disponibilidad hídrica es un factor crítico para evaluar los efectos del cambio climático sobre la mayoría de los ecosistemas terrestres. En los lugares con déficit hídrico, que representan gran parte de los ecosistemas de la Península Ibérica, se pueden esperar cambios que van desde la reducción de la densidad de especies arbóreas hasta alteraciones de la distribución de especies en general (Sabaté et al., 2002). Además



también habría que tener en cuenta la respuesta fotosintética positiva al aumento de CO<sub>2</sub> atmosférico, que puede aliviar parcialmente el efecto negativo del aumento de sequía.

Las sequías pueden ser moderadas o extremas, crónicas o agudas, recurrentes o esporádicas, y las respuestas de una misma especie pueden variar dependiendo de dichas características, así como del momento y la rapidez con que se establecen. Las predicciones sobre el cambio climático apuntan hacia un aumento de la duración e intensidad de las sequías durante el s. XXI, asociadas con un régimen más irregular de las precipitaciones y con temperaturas más extremas y en general más cálidas (IPCC, 2001). La heterogeneidad espacial de estas variables, especialmente de las relacionadas con el régimen de lluvias, es elevada, por lo que actualmente resulta difícil hacer predicciones para áreas concretas. No hay duda de que este cambio climático dará lugar a extinciones locales y cambios en la dominancia de las especies de muchos ecosistemas terrestres. La sequía limita el crecimiento y la supervivencia vegetal, actuando de filtro selectivo de especies según su tolerancia al estrés hídrico. Además afecta negativamente a la reproducción y altera los ritmos de producción de hojas, tallos, flores y frutos. La repetición cada vez más frecuente de los episodios de sequía puede acelerar también los cambios fenológicos a nivel de comunidad (Valladares et al., 2004).

Las condiciones de incremento de temperatura asociadas al cambio climático aumentarán el riesgo de sequías (Houghton et al., 2001) siendo probablemente el área mediterránea la zona con mayor impacto (Chaves y Pereira, 1992; Chaves et al., 2003) donde el agua es ya un factor limitante para el crecimiento de las plantas. El aumento de las sequías ejerce una gran influencia en la dinámica de nutrientes ya que el calentamiento aumenta la mineralización, y la sequía impide el uso de nutrientes por parte de las plantas y facilita las pérdidas del sistema cuando llegan las lluvias. Se trata pues de una situación en la que los factores implicados en el cambio climático (aumento de CO<sub>2</sub>, sequía, incremento de la temperatura,...) ejercen efectos diferentes, incluso antagónicos, sobre el ciclo de la materia y el funcionamiento de nuestros ecosistemas (Emmett et al., 2004).

### **1.1.2. Efecto de la elevada [CO<sub>2</sub>] y su interacción con otros estreses como la sequía**

La concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera se ha visto incrementada en los dos últimos siglos desde 280ppm hasta el valor actual de aproximadamente 400ppm, y se prevé que alcance más del doble de la concentración preindustrial en este siglo XXI (Houghton et al., 1990). Se espera que el aumento de la concentración de CO<sub>2</sub> tenga un impacto considerable en las plantas y la vegetación en general a través de cambios en la fotosíntesis y otros procesos fisiológicos (Drake et al., 1997). No es nada nuevo que la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera presente variaciones. El aire atrapado en el hielo de los polos muestra que el CO<sub>2</sub> descendió a concentraciones de 180-200ppm durante las glaciaciones del Pleistoceno, ascendiendo hasta aproximadamente 280ppm durante los periodos interglaciares (Barnola et al., 1987). Durante periodos geológicos más recientes, como en el Carbonífero Temprano, la concentración de CO<sub>2</sub> fue mucho mayor, de aproximadamente 1500ppm (Bernier, 1998), pero hacia mediados del carbonífero había disminuido hasta 350ppm –comparable a los actuales valores. Lo novedoso es que el aumento actual de CO<sub>2</sub> es provocado por la actividad humana a través de la quema de combustibles fósiles y la deforestación, lo que provoca un cambio más rápido que los acontecidos en el pasado geológico reciente (Tuba et al., 1999).

La exposición prolongada de las plantas a una atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub> produce una amplia variedad de respuestas tanto a nivel fisiológico como en el crecimiento de las mismas. En general, una [CO<sub>2</sub>] elevada aumenta la biomasa, el crecimiento de las raíces y el área total de las hojas, y altera las tasas de fotosíntesis neta, la conductancia estomática y la eficiencia en el uso del agua. No obstante, la magnitud de tales respuestas depende de la disponibilidad de otros recursos que pueden ser limitantes (Campbell et al., 1997). La disponibilidad de nitrógeno del suelo, la temperatura o la luz pueden afectar a dichas respuestas. Sin embargo, el factor más limitante para la productividad de los ecosistemas terrestres es el agua (Schulze et al., 1987). De ese modo, la interacción entre la elevada [CO<sub>2</sub>] y el agua del suelo es de capital relevancia para la comprensión de la respuesta de las plantas frente al cambio ambiental (Wullschleger et al., 2002).

A nivel global, no hay duda de que el aumento de CO<sub>2</sub> estimulará la producción primaria neta, pero no hay consenso en la magnitud de ese efecto, ni en lo que puede

pasar a largo plazo y menos aún en las complejas condiciones reales de los ecosistemas (Körner, 1995; Körner, 2000). Por ejemplo, las respuestas observadas podrían amortiguarse con el tiempo y, de hecho, en algunas especies se ha constatado aclimatación de la fotosíntesis tras seis años de crecimiento a alto CO<sub>2</sub> (Peñuelas et al., 1997). Por otro lado, el incremento en las concentraciones de CO<sub>2</sub> puede incrementar la síntesis de metabolitos secundarios en las plantas, lo cual podría dar protección contra plagas y patógenos, pero el aumento de la relación C/N podría estimular el consumo de la planta por herbívoros y empeorar la calidad de la materia orgánica del suelo (Sebastiá et al., 2003). En resumen, las tendencias esperables en las tasas fotosintéticas con un aumento de CO<sub>2</sub> se confirman en revisiones recientes, pero no así las tendencias sobre productividad primaria, la cual varía con la especie (Poorter y Navas, 2003) e interacciona de forma compleja con otros recursos como el agua y el nitrógeno (Nowak et al., 2004).

La cebada siempre ha sido uno de los cereales más cultivados del mundo y se ha documentado que su productividad podría aumentar hasta un 0,35% por ppm de CO<sub>2</sub> incrementado en la atmósfera (Manderscheid y Weigel, 1995). Su cultivo es generalizado en la península ibérica (Lopes et al., 2004) donde es frecuente el estrés hídrico y parece ser, de entre los cereales de clima templado, el mejor adaptado a la restricción hídrica (Sánchez-Díaz et al., 2002). Son numerosos los estudios realizados sobre cebada y elevado CO<sub>2</sub> (Kleemola et al., 1994; Hibberd et al., 1996; Sicher y Bunce, 1997; Bunce, 2000; Sicher, 2001; Kurasová et al., 2003a, b) pero menos numerosos los realizados en conjunción con la sequía. Tan sólo ha sido analizada la interacción de la humedad atmosférica con el elevado CO<sub>2</sub> en plantas de cebada por Bunce (2000), considerando, por otro lado, que un aumento del CO<sub>2</sub> atmosférico puede mitigar los efectos negativos de otros estreses ambientales (Kriedemann et al., 1976; Rogers et al., 1984; Hsiao, 1993; Baker et al., 1997).

## **1.2. Interés y objetivos generales**

Dadas las significativas interacciones que se producen entre el elevado CO<sub>2</sub> y la sequía, y las implicaciones que tales interacciones pueden tener tanto a nivel de producción agrícola como a nivel de los ecosistemas, sigue siendo de gran interés profundizar en este campo de investigación. Debido a las complejas interacciones que

se producen entre estos dos factores y a la variación interespecífica observada, es preciso continuar la investigación abordándola desde múltiples enfoques. Además, los intentos para disminuir un estrés, o para mejorar la resistencia o la adaptación de las plantas a dicho estrés, tendrán mayor alcance si se entiende el trasfondo fisiológico y bioquímico en el que se basan las respuestas de las plantas. Con dicho conocimiento sería posible desarrollar estrategias de manejo razonables para disminuir las pérdidas debidas a las distintas clases de estrés (Benavides, 2002).

En nuestro laboratorio se ha venido utilizando el cultivar de cebada “Iranis” en estudios combinados de salinidad y CO<sub>2</sub>, así como de elevado CO<sub>2</sub> y limitación de nitrógeno. No obstante, hasta el presente estudio, no había datos sobre su grado de tolerancia a la sequía en condiciones futuras de [CO<sub>2</sub>] doble a la actual. Por tanto, se ha realizado un análisis paralelo de la sequía y el elevado CO<sub>2</sub> en Iranis así cómo su posible respuesta fisiológica a la recuperación hídrica tras la sequía.

Por ello, el objetivo general del presente estudio fue analizar el efecto combinado del enriquecimiento de CO<sub>2</sub> y el estrés hídrico durante la imposición progresiva de sequía, cuantificando las respuestas fisiológicas del cultivar Iranis tanto desde el punto de vista de las relaciones hídricas como del intercambio gaseoso, así como la fotoquímica de la fotosíntesis, la asimilación de nutrientes como el N y su respuesta al crecimiento, analizando, además, la capacidad de las plantas para recuperarse del estrés hídrico, tanto bajo las condiciones de la atmósfera actual (350 μmol CO<sub>2</sub> mol), como con la perspectiva de mayores niveles de CO<sub>2</sub> (700 μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>). De esta forma, también podemos desglosar el objetivo general en los siguientes objetivos parciales:

- Determinar el balance hídrico en el suelo y la planta en condiciones de sequía bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental, así como comprobar si existe ajuste osmótico como factor de aclimatación en respuesta al estrés hídrico.
- Averiguar si la elevada [CO<sub>2</sub>] modifica dicho balance hídrico y analizar si el elevado CO<sub>2</sub> desempeña un papel modificador en la aclimatación a la sequía.
- Conocer los efectos de la sequía en el metabolismo fotosintético bajo ambas [CO<sub>2</sub>], ambiental y elevada. Además, ver si existe aclimatación de la asimilación en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> y determinar si la mejor conservación del agua en las plantas que crecen a elevado CO<sub>2</sub> se debe a un ajuste estomático.

- Analizar el efecto combinado de la sequía y el elevado CO<sub>2</sub> sobre el funcionamiento del aparato fotosintético mediante el análisis de la fluorescencia de la clorofila *a*, y determinar si el elevado CO<sub>2</sub> mejora la utilización de la energía lumínica capturada, de modo que el riesgo de fotoinhibición en condiciones de estrés hídrico disminuye.
- Estudiar cómo afecta la sequía a los procesos de reducción de N y de incorporación de amonio analizando si el CO<sub>2</sub> modifica, potencia o amortigua el efecto de la sequía en el metabolismo del N y en la concentración de proteínas totales.
- Analizar si el aumento de CO<sub>2</sub> modifica la producción de biomasa de las plantas y estudiar si dicho enriquecimiento en CO<sub>2</sub> mitiga o potencia el efecto de la sequía; así como dilucidar qué parámetros de crecimiento relativo son los responsables de dichos cambios en la producción de biomasa.
- Analizar la capacidad de las plantas para recuperarse del estrés hídrico, tanto bajo condiciones de [CO<sub>2</sub>] ambiental como de elevada [CO<sub>2</sub>].

# SEGUNDO CAPÍTULO

## MATERIALES Y MÉTODOS

**2.1. Material vegetal**

**2.2. Diseño experimental**

**2.3. Relaciones hídricas**

**2.4. Asimilación de CO<sub>2</sub>**

**2.5. Fluorescencia**

**2.6. Metabolismo del nitrógeno**

**2.7. Cuantificación de proteína soluble**

**2.8. Extracción y determinación de pigmentos fotosintéticos**

**2.9. Parámetros de crecimiento**

**2.10. Tratamiento estadístico**



## 2.1. Material vegetal

La cebada (*Hordeum vulgare* L. cv. Iranis) pertenece a la familia *Graminaeae*, dentro del orden *Glumiflorae*, subclase *Monocotyledoneae*, clase *Angiospermae*. Esta especie presenta metabolismo C<sub>3</sub>, con hojas estrechas de color verde claro, generalmente glabras, raramente pubescentes y anfiestomáticas (Fig. 2.1). Es una variedad de talla media y excelente rendimiento que destaca por su regularidad y rusticidad. Presenta un alto índice de ahijamiento y buen comportamiento fitosanitario así como un ciclo medio-precoz por lo que se recomiendan siembras de diciembre a enero según zonas. Los cultivares invernales, como es Iranis, muestran hojas rizadas y más angostas. El tallo es erecto, grueso, formado por seis u ocho entrenudos más anchos en la parte central que en los extremos junto a los nudos. El sistema radicular es fasciculado, fibroso y alcanza poca profundidad en comparación con la de otros cereales. Se estima que un 60% del peso de las raíces se encuentra en los primeros 25 cm del suelo. Para la conservación de los caracteres de una variedad determinada, las flores se mantienen cerradas hasta después de haberse realizado la fecundación.

Su cultivo se conoce desde tiempos remotos y se supone que procede de dos centros de origen, situados en el sudeste de Asia y en África septentrional. Se cree que fue una de las primeras plantas domesticadas al comienzo de la agricultura. Las cebadas cultivadas se distinguen por el número de espiguillas que queda en cada diente del ráquis. En la cebada de dos carreras, como es el caso de la variedad Iranis, solamente queda la espiguilla intermedia mientras afloran las laterales.

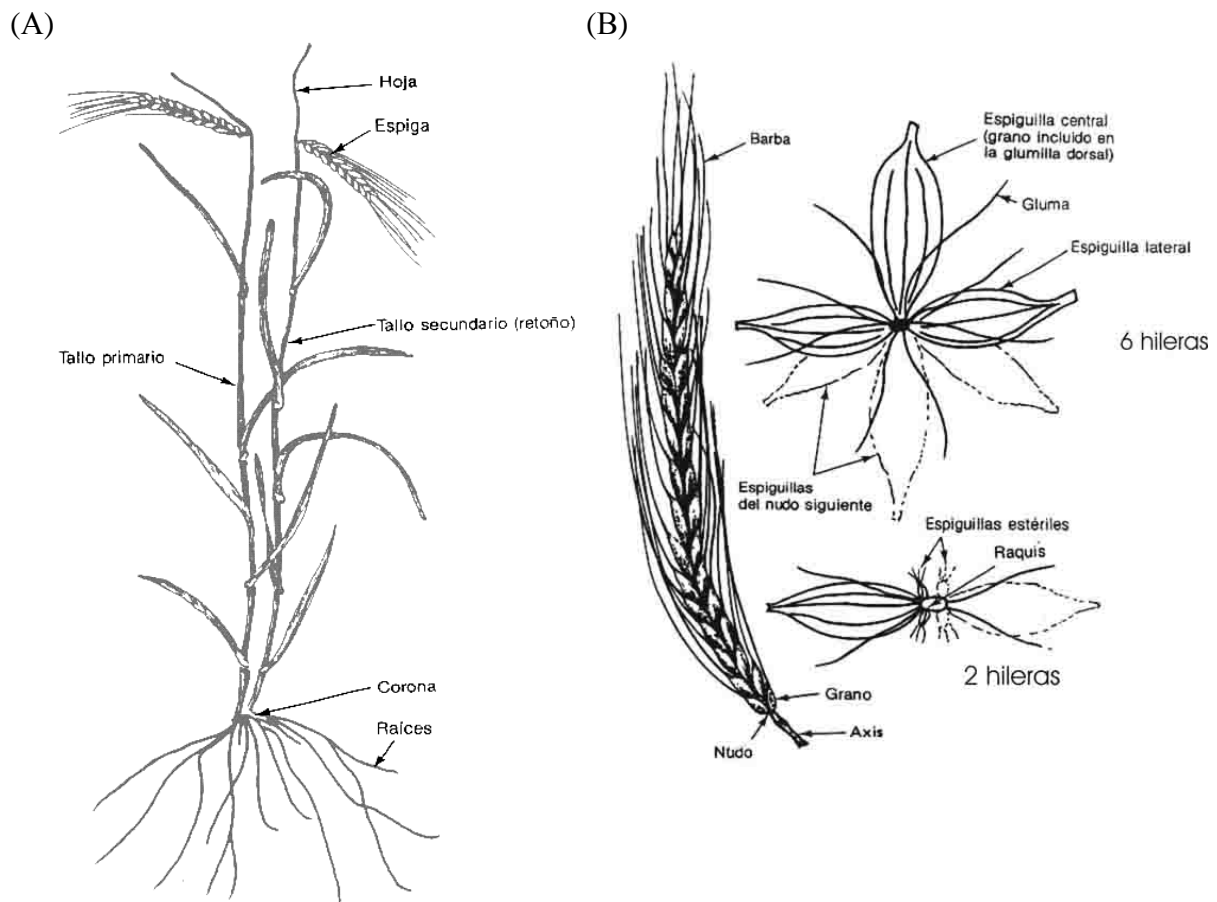
Esta gramínea es anual y está adaptada a un amplio rango de condiciones ambientales en las zonas templadas y frías. Las exigencias en cuanto al clima son muy pocas, por lo que su cultivo se encuentra muy extendido, aunque crece mejor en los climas frescos y moderadamente secos. La cebada requiere menos aporte calórico para alcanzar la madurez fisiológica y por ello llega hasta elevadas latitudes y altitudes.

La cebada ocupa el cuarto lugar en importancia económica entre los cereales, después del trigo, maíz y arroz. La razón de su importancia se debe a su amplia adaptación ecológica y a la diversidad de aplicaciones. Los principales países productores a nivel mundial son Alemania, Canadá, Francia y Ucrania.

Esta especie requiere tierras fértiles para su cultivo, pero presenta una buena producción en suelos poco profundos y pedregosos cuando no falta el agua al comienzo de su desarrollo. Además, la cebada tolera bien el exceso de sales en el suelo, siendo el cereal de



mayor tolerancia a la salinidad; así, puede soportar niveles de hasta  $8 \text{ dSm}^{-1}$  en el extracto de saturación del suelo, sin que vea afectado el rendimiento.



**Fig. 2.1.** (A) Detalles en planta entera y (B) detalles de la espiga de cebada: espiga de una cebada de dos filas (esquema inferior) espiga de una cebada de seis filas vistas desde arriba (esquema superior). El trazo discontinuo representa las florecillas que están adheridas al nudo siguiente ([www.cervezadeargentina.com.ar/articulos/maltas.htm](http://www.cervezadeargentina.com.ar/articulos/maltas.htm))

La cebada se emplea en la alimentación aunque también tiene importantes aplicaciones en la industria. En su composición cabe destacar la gran cantidad de hidratos de carbono, sobre todo en el grano, así como de proteínas (Lopez Bellido, 1991).

## 2.2. Diseño experimental

En este trabajo se utilizaron semillas de cebada certificadas, variedad Iranis, suministradas por Semillas Batlle (Barcelona).

### 2.2.1. Condiciones de crecimiento

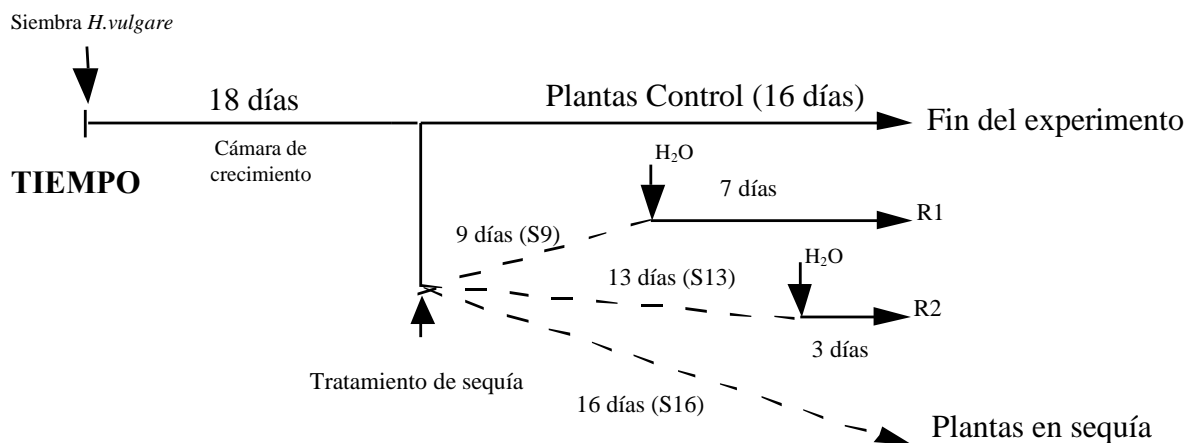
Se sembraron de 8 a 10 semillas de cebada por tiesto (2,5 l de capacidad) en una mezcla de perlita/vermiculita 3/1 (v/v) y se regaban con agua desionizada hasta que germinaban. Una vez emergidas, se dejaban 7 plántulas de cebada por tiesto (11,2 g/m<sup>2</sup>) y se comenzaba el riego con solución nutritiva Hoagland (Arnon y Hoagland, 1940) modificada hasta contener 20 mM de nitrógeno en forma de nitratos (González-Moro et al., 2003). Se alternaban dos riegos con solución Hoagland y un riego con agua desionizada para evitar la acumulación de sales.

Los tiestos se mantuvieron desde el momento de la siembra en cámara de crecimiento Conviron E15 (Conviron, Manitoba, Canadá) en condiciones controladas bajo una radiación fotosintéticamente activa (PAR) de 400  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  proporcionada por una combinación de bulbos incandescentes y lámparas fluorescentes (warm-white Sylvania F48T12 SHO/VHO, Sylvania, USA) con un fotoperiodo de 14 h de luz y 10 h de oscuridad. La temperatura fue 24/20 °C, día/noche, y la humedad relativa (HR) 60/80%, día/noche. Las cámaras se mantuvieron a 350  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  ([CO<sub>2</sub>] ambiental) ó 700  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  ([CO<sub>2</sub>] elevada) desde el momento de la siembra.

### 2.2.2. Imposición de la sequía y recuperación del estrés hídrico

El diseño experimental se resume gráficamente en la Fig. 2.2. Así, transcurridos 18 días desde la siembra (día 0 del estudio: D0) comenzó el experimento de sequía y posterior recuperación hídrica. Se analizaron diversos parámetros fisiológicos a los 9 días (D9), 13 días (D13) y 16 días (D16) del inicio del experimento.

La sequía (S) se impuso suspendiendo el riego. Paralelamente se mantuvieron plantas bien regadas como control. Con la intención de estudiar la capacidad de recuperación tras el periodo de sequía, a los tratamientos S9 y S13 se les restableció el riego, R1 y R2, respectivamente.



**Fig. 2.2.** Esquema del diseño experimental.

### 2.2.3. Toma de muestras y congelación del material vegetal

Para realizar todos los ensayos de relaciones hídricas, crecimiento, intercambio gaseoso, pigmentos fotosintéticos y fluorescencia se utilizaba material fresco. Para la determinación del resto de parámetros se empleaba material vegetal congelado.

Para cada tratamiento, se muestreaba siempre la misma hoja, siendo ésta la siguiente más joven a la utilizada para los experimentos de relaciones hídricas, intercambio gaseoso y fluorescencia, es decir se muestreaba la segunda hoja verdadera. Tras 3 horas desde el amanecer, una vez adaptadas las plantas a la luz dentro de la cámara de crecimiento, se procedía a escindir de forma rápida la hoja. Se desechaba la parte apical y basal de la hoja. El resto se troceaba, se pesaba y se congelaba en nitrógeno líquido almacenándose en el congelador a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

## 2.3. Relaciones hídricas

### 2.3.1. Contenido hídrico relativo del suelo, CHRS

La determinación del contenido hídrico relativo del suelo se realizaba tomando una muestra del sustrato donde crecían las plantas, siempre del mismo volumen, una vez extraídas las plantas del tiesto. La fórmula utilizada fue:

$$\text{CHRS (\%)} = 100 \left[ \frac{\text{PFs} - \text{PSs}}{\text{PFis} - \text{PFs}} \right]$$

donde PFs es el peso fresco de la muestra de suelo, PSs es el peso seco del suelo correspondiente y PFis es el peso fresco del suelo del control al inicio del experimento (Epron, 1997). El PSs se obtenía tras secar la muestra en la estufa durante un mínimo de 72 horas a 105 °C. Se asumía que el contenido de agua a capacidad de campo era 100%.

### 2.3.2. Contenido hídrico relativo foliar, CHR

El contenido hídrico relativo foliar se determinaba mediante método gravimétrico según Bennett et al. (1987) utilizando la ecuación:

$$\text{CHR (\%)} = 100 [(\text{PF}-\text{PS})/(\text{PT}-\text{PS})]$$

donde PF, PS y PT son peso fresco, seco y turgente de la hoja, respectivamente. Para obtener el PT, una vez obtenido el PF, se mantenía la hoja escindida en un tubo de vidrio con agua desionizada durante 24 horas a 5 °C. El PS se obtenía tras secar la muestra en la estufa hasta alcanzar un peso constante. Esto requería mantener la muestra en la estufa durante un mínimo de 48 horas a 80 °C.

### 2.3.3. Potencial hídrico foliar, $\Psi_{w_{pd}}$ , $\Psi_{w_{md}}$

Las medidas se realizaban en el ápice de la misma hoja, la primera hoja verdadera, para hacer un seguimiento temporal a lo largo del estudio.

La medición del potencial hídrico foliar se realizaba mediante el método propuesto por Scholander et al. (1965) utilizando una cámara de presión Scholander mod. 3005 (Soil Moisture Equipment Corp., Santa Barbara, USA). Para ello se hacía un corte limpio en oblicuo en el ápice de la hoja con un bisturí y se recubría con papel de filtro con el fin de protegerla. Inmediatamente, se introducía la hoja en la tapa de la cámara de presión, se cerraba herméticamente y se aplicaba presión mediante una bala de nitrógeno hasta el momento en que la presión aplicada sobre los tejidos llegaba a compensar la presión xilemática (Boyer, 1995). A partir de este instante se podía ver como afloraba el líquido xilemático en forma de gota por la superficie de corte.

Esta medida se llevaba a cabo al amanecer después del periodo nocturno en que la planta se recupera debido a la menor demanda transpiratoria ( $\Psi_{w_{pd}}$ ), y en el momento en el que la planta soportaba una mayor demanda de agua ( $\Psi_{w_{md}}$ ).

### 2.3.4. Potencial osmótico, $\Psi_o$ , potencial osmótico a máxima turgencia, $\Psi_o^{100}$ y ajuste osmótico, AO

Para calcular el potencial osmótico foliar, o de solutos, se congelaban en tubos eppendorf de 0,5 ml de capacidad pequeñas cantidades (aproximadamente 2,5 cm<sup>2</sup>) de la misma hoja utilizada para medir el potencial hídrico. Estos tubos, con una incisión en su base y sin tapa, se hallaban dentro de otro tubo eppendorf de 1,5 ml con una incisión en la tapa. Tras 5 minutos como mínimo de congelación, se centrifugaban durante 5 minutos a 13.200 rpm, pasando el jugo celular al tubo de 1,5 ml y quedando en el tubo de 0,5 ml la porción sólida celular que se desechaba. Se tomaban 25  $\mu$ l de muestra del jugo celular de cada tubo de 1,5 ml y tras mantenerlo a 25 °C durante 10 minutos se medía la concentración de osmolitos en un osmómetro Osmomat 030 (Gonotec GMBH, Berlín, Alemania). A partir del dato proporcionado por el osmómetro se calculaba el potencial osmótico según [Wyn Jones y Gorham \(1983\)](#) mediante la fórmula:

$$\Psi_o \text{ (MPa)} = M T 0,0832$$

donde M es la concentración de osmolitos que nos da el osmómetro (osmol Kg<sup>-1</sup>) y T la temperatura absoluta (°K) de la muestra. El valor fijo, 0,0832, se corresponde a la constante universal de los gases (Kg MPa mol<sup>-1</sup> °K<sup>-1</sup>).

Al igual que el  $\Psi_w$ , la determinación del  $\Psi_o$  se llevó a cabo tanto al amanecer ( $\Psi_{o_{pd}}$ ) como al mediodía ( $\Psi_{o_{md}}$ ).

El ajuste osmótico (AO) se calculó como la diferencia entre el potencial osmótico de plantas control y de plantas sometidas a sequía.

El potencial osmótico a máxima turgencia ( $\Psi_o^{100}$ ) se calculó según [Ludlow et al. \(1983\)](#), por medio de la fórmula:

$$\Psi_o^{100} \text{ (MPa)} = \Psi_o \text{ (CHR - 10)/90}$$

donde CHR es el contenido hídrico relativo foliar (%).

### 2.3.5. Potencial de presión, $\Psi_p$

El valor del potencial de presión se calculaba a partir de los potenciales hídrico y osmótico, de manera que:

$$\Psi_p \text{ (MPa)} = \Psi_w - \Psi_o$$

### 2.3.6. Transpiración en planta entera, $T$

El cálculo de la transpiración en planta entera se realizaba pesando cada tiesto a diario a la misma hora, antes y después de regar (De Luis et al., 1999). Así, se obtenía el agua perdida en 24 horas resultado de la transpiración foliar y de la evaporación edáfica. Para conocer el agua evaporada se ponían tiestos sin planta que recibían cada día el mismo tratamiento de riego y pesaje. Para determinar el agua transpirada por la planta se restaba el valor de agua evaporada al dato obtenido del tiesto con planta.

### 2.3.7. Conductancia hidráulica, $CH$

La conductancia hidráulica se calculaba según Johnson et al. (2002). Se estimaba dividiendo la tasa de transpiración ( $T$ ), expresada por el área foliar de cada planta, entre la diferencia obtenida de la resta del potencial hídrico medido en el amanecer ( $\Psi_{w_{pd}}$ ) menos el potencial hídrico medido al mediodía ( $\Psi_{w_{md}}$ ), de manera que:

$$CH \text{ (g H}_2\text{O cm}^{-2} \text{ día}^{-1} \text{ MPa}^{-1}) = \text{g H}_2\text{O cm}^{-2} \text{ día}^{-1} / (\Psi_{w_{pd}} - \Psi_{w_{md}})$$

### 2.3.8. Eficiencia en el uso del agua, $ITE$ y $EUA$

La eficiencia instantánea en el uso del agua ( $ITE$ ) se calculaba según Maroco et al. (1999). Para ello se utilizó la fórmula:

$$ITE \text{ (instantánea)} = A/E \text{ (}\mu\text{mol CO}_2 \text{ fijado mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O transpirado)}$$

La eficiencia en el uso del agua por planta entera (*EUA*) se calculó como la relación entre la materia seca producida y el agua transpirada necesaria para producir dicha materia, de modo que las unidades son  $\text{g PS kg}^{-1} \text{H}_2\text{O planta}$ .

### 2.3.9. Conductividad electrolítica

Para calcular la integridad de las membranas y su posible alteración durante el estudio se realizaron medidas de la pérdida electrolítica a través de las membranas celulares utilizando para ello el método propuesto por McKay (1992) con modificaciones según Mena-Petite et al. (2001). Se pesaban 0,1 g de hojas y se introducían en viales de plástico (lavados abundantemente con agua desionizada) conteniendo 16 ml de agua desionizada de conductividad conocida ( $C_0$ ). Los recipientes se cerraban, se agitaban y se colocaban a temperatura ambiente durante 24 horas procurando que el material vegetal permaneciera siempre en contacto con el agua. Al cabo de ese tiempo se volvían a agitar y se procedía a medir de nuevo la conductividad de la muestra ( $C_{24}$ ). A continuación, las muestras se autoclavaban durante 10 minutos a 110 °C, para romper las membranas celulares y conseguir la salida de todos los electrolitos al medio. Los viales se dejaban enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, determinándose entonces la conductividad total del agua para cada muestra ( $C_T$ ).

Para valorar el porcentaje de conductividad electrolítica se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{Conductividad electrolítica (\%)} = 100 [(C_{24}-C_0)/(C_T-C_0)]$$

## 2.4. Asimilación de $\text{CO}_2$

Para las medidas de intercambio gaseoso y los parámetros relacionados se utilizaba un analizador de gases programable portátil, LI 6400-092B (Li-Cor, Inc. Nebraska). Todas las medidas se realizaron en la primera hoja verdadera a partir de la 3ª hora de luz desde el inicio del fotoperiodo.

Las condiciones de medida eran de  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad de luz, 24 °C, 60% HR, 350 ó 700  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  de referencia, según el tratamiento, y una tasa de flujo de aire de  $250 \mu\text{mol s}^{-1}$ . Una vez colocada la hoja en la cámara de la pinza se medía su anchura para calcular el área que ocupaba mediante la fórmula del área del rectángulo. Se

introducía el dato del área en el analizador LI 6400-092B y, una vez cerrada la pinza, se dejaba un tiempo de estabilización antes de grabar el dato en el medidor.

### 2.4.1. Asimilación neta de CO<sub>2</sub>

A partir de estas medidas se calculaban los datos referentes a la asimilación neta de CO<sub>2</sub>,  $A$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); la transpiración instantánea,  $E$  ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); la conductancia estomática,  $g_s$  ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y la concentración interna de CO<sub>2</sub>,  $C_i$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ) en condiciones de crecimiento.

### 2.4.2. Aclimatación

La fotosíntesis neta en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> depende del efecto directo del CO<sub>2</sub> y del efecto de la aclimatación. Para estudiar si en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> se producía un proceso de aclimatación se midió la  $A$  bajo condiciones de elevado CO<sub>2</sub> en plantas crecidas a CO<sub>2</sub> ambiente (a,E). Conociendo tanto la  $A$  de las plantas medidas y crecidas a CO<sub>2</sub> ambiente (a,A), así como de las crecidas y medidas a elevado CO<sub>2</sub> (e,E), se aplicaron los cálculos propuestos por [Bunce \(2001\)](#), donde:

$$\text{Efecto de la aclimatación} = (e,E)/(a,E)$$

$$\text{Efecto directo} = (a,E)/(a,A)$$

$$\text{Efecto neto (efecto de la aclimatación x efecto directo)} = (e,E)/(a,A)$$

### 2.4.3. Rendimiento y requerimiento cuánticos

A partir de los parámetros obtenidos en la asimilación de CO<sub>2</sub> se calcularon los siguientes parámetros:

El rendimiento cuántico se calculaba a partir de la  $A$  y de la intensidad luminosa ( $I$ ) a la que se realizaba la medida de fotosíntesis:

$$\phi (\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol fotones}^{-1}) = A/I$$

El requerimiento cuántico se calculaba como el inverso del rendimiento cuántico:



$$RQ (\mu\text{mol fotones } \mu\text{mol}^{-1} \text{CO}_2) = 1/\phi$$

#### 2.4.4. Curvas de respuesta a la $[\text{CO}_2]$ , $A/C_i$

Para realizar las curvas de respuesta a la  $[\text{CO}_2]$  se utilizaba la opción AUTOPROGRAM proporcionada por el software del equipo LI 6400-092B. La intensidad de luz era  $1200 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , la temperatura de la pinza  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  y el flujo de aire  $500 \mu\text{mol s}^{-1}$ . Las concentraciones de  $\text{CO}_2$  de referencia eran 2000, 1600, 1300, 1000, 850, 700, 550, 350, 250, 150, 100, 80 y  $60 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  aire. Tras medir a cada concentración de  $\text{CO}_2$  durante 120 segundos se grababan automáticamente los datos.

A partir de los datos recopilados se calculaban los siguientes parámetros fotosintéticos:

Tasa máxima de carboxilación ( $V_{cmax}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )

Tasa máxima de transporte electrónico ( $J_{max}$ ,  $\mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )

Tasa de asimilación máxima ( $A_{max}, C_i \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )

Respiración mitocondrial a la luz por unidad de área foliar ( $R_l$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )

Utilización de las triosas fosfato (TPU,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )

Punto de compensación de  $\text{CO}_2$  ( $\Gamma_{\text{CO}_2}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ )

Estos parámetros eran obtenidos utilizando el modelo mecanístico de asimilación de  $\text{CO}_2$  incluido en el programa Photosyn Assistant diseñado por Parson y Ogstone (1997), que siguieron los modelos propuestos por von Caemmerer y Farquhar (1981), Farquhar et al. (1980), Harley y Sharkey (1991), Harley et al. (1992) y Sharkey (1985).

También se determinaban la eficiencia de carboxilación (CE,  $\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), que es la pendiente inicial de la curva, y las limitaciones estomática  $L_s$  (%) y mesofílica  $L_m$  (%). Estas últimas se calculaban según Farquhar y Sharkey (1982), y Jacob y Lawlor (1991).

Así, la limitación estomática, que representa la limitación impuesta por los estomas al paso del  $\text{CO}_2$  al interior de la hoja, se calculaba como:

$$L_s (\%) = [(A_o - A) / A_o] 100$$

siendo  $A_o$  la asimilación cuando  $C_i=C_a$ , donde  $C_i$  es la  $[\text{CO}_2]$  interna y  $C_a$  es la  $[\text{CO}_2]$  a la que crecen las plantas.  $A$  es la tasa de asimilación que realmente ocurre a la  $C_i$  correspondiente a la  $C_a$  ambiental.

La limitación mesofílica, que se corresponde con la limitación del mesófilo a la difusión del  $\text{CO}_2$  desde la cavidad subestomática al lugar de carboxilación del la Rubisco, se calculaba así:

$$Lm (\%) = [(A_{oc}-A_{os})/A_{oc}] 100$$

donde  $A_{oc}$  es la asimilación cuando  $C_i=C_a$  de las plantas Control y  $A_{os}$  es la asimilación cuando  $C_i=C_a$  del tratamiento de sequía.

#### 2.4.5. Curvas de respuesta a la luz, $A/PPFD$

Para determinar las curvas de respuesta a la luz se utilizó la opción AUTOPROGRAM del software del equipo LI 6400-092B. La  $[\text{CO}_2]$  de referencia fue 350 ó 700  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ , la temperatura de la pinza 24 °C y el flujo de aire 500  $\mu\text{mol s}^{-1}$ . Las intensidades de luz fueron 25, 50, 75, 100, 125, 250, 400, 500, 750, 900, 1000, 1200 y 1400  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Tras medir a cada intensidad de luz durante 200 segundos se grababan, automáticamente, los datos.

A partir de los datos recopilados se calculaban los siguientes parámetros fotosintéticos:

Tasa de respiración a la oscuridad ( $R_d$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )

Eficiencia cuántica aparente ( $\Phi_{\text{CO}_2}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol fotones}^{-1}$ )

Asimilación máxima ( $A_{\text{max,luz}}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )

Punto de compensación de la luz ( $\Gamma_{\text{luz}}$ ,  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )

Punto de saturación de la luz (PSL,  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )

Estos índices fueron obtenidos utilizando el modelo de respuesta a la luz incluido en el programa Photosyn Assistant confeccionado por Parson y Ogstone (1997), que siguieron los modelos propuestos por von Caemmerer y Farquhar (1981), Farquhar et al. (1980), Harley y Sharkey (1991), Harley et al. (1992) y Sharkey (1985).

## 2.5. Fluorescencia

La cinética de la fluorescencia de la clorofila *a* se determinó utilizando un fluorímetro OS5-FL (Opti-Sciences, Inc., Tyngsboro, USA), como describió [González-Moro et al. \(2003\)](#).

Esta medida se realizaba en la primera hoja verdadera antes del inicio del fotoperiodo. Así, las plantas se mantenían en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente para permitir una completa reoxidación de los centros de reacción del PSII; esto relaja los coeficientes de disipación (quenching) energía-dependientes ([Werner et al., 1999](#)). La luz modulada se correspondía con una longitud de onda de 660 nm con una intensidad de 0,25  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y una frecuencia de 500 Hz, para determinar la señal de fluorescencia basal ( $F_o$ ). Después se aplicaba un pulso de luz saturante de 7800  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  durante 0,8 segundos para medir la fluorescencia máxima ( $F_m$ ) y calcular la eficiencia fotoquímica máxima del PSII ( $F_v/F_m$ ):

$$F_v/F_m = (F_m - F_o) / F_m$$

La luz actínica era proporcionada por una lámpara de luz roja de 400  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Se emitieron pulsos saturantes cada 15 segundos para producir el cierre de los centros fotoquímicos de reacción del PSII durante la iluminación con la luz actínica hasta conseguir el estado basal de la fluorescencia variable ( $F_s$ ). La fluorescencia máxima de la planta adaptada a la luz ( $F'm$ ) se obtenía tras iluminar con pulsos de luz blanca saturante. Posteriormente, para obtener la fluorescencia mínima en plantas previamente iluminadas ( $F'o$ ), se apagaba la fuente de luz actínica para producir la máxima oxidación de los aceptores de electrones del PSII y se aplicaba iluminación con luz del rojo lejano (735 nm) de intensidad 5,88  $\text{mW s}^{-1}$  durante 10 segundos. Esta luz excitaba selectivamente al PSI mejorando la tasa de reoxidación de los aceptores del PSII.

La eficiencia de los centros de reacción abiertos se calculó a partir de la relación entre la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima de hojas iluminadas:

$$F'v/F'm = (F'm - F'o) / F'm$$

calculada a partir de  $F'v = F'm - F'o$  y  $F'm$ , según [Genty et al. \(1989\)](#).

El quenching fotoquímico ( $qP$ ) se calculó a partir de:

$$qP = (F'm - F_s) / (F'm - F'o)$$

El quenching no fotoquímico ( $qNP$ ) se calculó a partir de:

$$qNP = (F_m - F'm) / (F_m - F'o)$$

El rendimiento cuántico de la fotosíntesis ( $\Phi_{PSII}$ ) se calculó a partir de:

$$\Phi_{PSII} = (F'm - F_s) / F'm = qP (F'v / F'm)$$

La tasa aparente de transporte de electrones ( $ETR$ ) se calculó como:

$$ETR (\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}) = \Phi_{PSII} PPDF \times 0,84 \times 0,5$$

donde  $PPDF$  era el flujo fotónico fotosintético incidente en la hoja ( $400 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y 0,84 el coeficiente de absorción de las hojas, asumiéndose que 0,5 es la fracción de energía de excitación distribuida para el PSII.

Todos estos parámetros eran proporcionados por el fluorímetro que los calculaba midiendo en modo KINETICS, en base a [Genty et al. \(1989\)](#), [Schreiber y Neubauer \(1987\)](#), y [Schreiber y Rientis \(1987\)](#).

El quenching no fotoquímico a la luz ( $NPQ$ ) es un valor alternativo al  $qNP$  y proporciona una estimación del quenching sin necesidad de conocer  $F_o$ . Dicho parámetro se calculaba según [Schreiber et al. \(1986\)](#) como:

$$NPQ = (F_m - F'm) / F'm$$

Una vez conocidos el  $ETR$  proporcionado por el fluorímetro, así como la respiración a la luz ( $RI$ ) obtenida de las curvas  $A/C_i$  y la asimilación neta obtenida en condiciones de crecimiento ( $P_n$ ), se calculó el transporte de electrones total y su distribución. Del flujo total de electrones,  $J_t (=ETR)$ , se estima que una parte es destinada a carboxilación,  $J_c$ , y otra a oxigenación,  $J_o$ . Por tanto, se aplicaron las siguientes ecuaciones propuestas por [Epron et al. \(1995\)](#), donde:

$$J_t (\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}) = \Phi_{PSII} PPDF \times 0,84 \times 0,5 = J_c + J_o$$

$$Jc (\mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}) = 1/3 [Jt + 8 (Pn + Rl)]$$

$$Jo (\mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}) = 2/3 [Jt - 4 (Pn + Rl)]$$

## 2.6. Metabolismo del nitrógeno

### 2.6.1. Actividad Nitrato Reductasa, NR

La actividad Nitrato Reductasa (EC, 1.6.6.1, NR) se determinaba en el extracto congelado de hoja mediante ensayo *in vitro*, que permite conocer la capacidad total de la planta para la reducción de nitrato cuando ni éste ni el donador de electrones son limitantes (Hageman y Reed, 1980; Lacuesta et al., 1990).

#### 2.6.1.1. Extracción

Para realizar el extracto enzimático se homogeneizaba 0,1 g de material vegetal congelado en 1 ml de tampón de extracción. El medio tamponado para la extracción de la NR contenía: HEPES-KOH 100 mM pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 20 mM; FAD 10 μM; Leupeptina 1 μM; Pefablock 1 mM; PMSF 0,2 mM; DTT 5 mM; PVPP 2% y Caseína 0,05% (Abd-El Baki et al., 2000). Una vez preparado el tampón de extracción se mantenía en baño de hielo.

El proceso de homogeneización se realizaba continuamente en frío, manteniendo los morteros de porcelana con nitrógeno líquido. Tras una centrifugación a 4 °C y 16.000 g en una microcentrífuga, se recogía el sobrenadante.

#### 2.6.1.2. Determinación de la actividad

La actividad NR se determinaba según el método descrito por Abd-El Baki et al. (2000) con NADH como donador de electrones. El tampón de reacción (250 μl) consistía en: HEPES-KOH 50 mM pH 7,6; FAD 10 μM; DTT 1 mM; KNO<sub>3</sub> 5 mM; NADH 0,2 mM; MgCl<sub>2</sub> 20 mM y Na<sub>2</sub>.EDTA 20 mM.

La NR es un enzima regulado por fosforilación. Cuando se fosforila se liga a una proteína inhibitoria (14-3-3) en presencia de magnesio (Mg<sup>2+</sup>). La medida de la actividad NR en presencia de Mg<sup>2+</sup> representa la actividad real del enzima en contraposición a la actividad máxima potencial, que se obtiene al medir en presencia de EDTA. Por tanto, en el ensayo de este enzima se realizaban dos microensayos, utilizando dos medios de reacción diferentes,

uno con  $\text{MgCl}_2$  y sin EDTA, y otro con EDTA y sin  $\text{MgCl}_2$ . En ambos, la reacción comenzaba añadiendo 50  $\mu\text{l}$  de extracto enzimático dejándose incubar durante 5, 10, 15 ó 20 min a  $30^\circ\text{C}$ . Se observó que la actividad era constante a lo largo de este periodo, estimándose, por tanto, que un periodo de 5 min era suficiente para su cuantificación. Tras este periodo de tiempo se procedía a parar la reacción con 32  $\mu\text{l}$  de acetato de zinc 0,5 M. En los tubos blancos, uno para cada muestra, se añadía el acetato de zinc antes que el extracto enzimático. Este proceso generalmente provoca la desnaturalización protéica del extracto vegetal. A continuación se centrifugaba de nuevo durante 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$  y 16.000 g. Un vez recogidos 200  $\mu\text{l}$  del nuevo sobrenadante se añadían 2  $\mu\text{l}$  PMS 0,5 mM, se agitaba y se dejaba 20 minutos en oscuridad, con el objetivo de oxidar el resto de NADH no oxidado por el enzima. Seguidamente, se procedía a la determinación del nitrito obtenido, mediante la reacción de diazotización de Gress-Yllosway. Así, a los microtubos, con los 202  $\mu\text{l}$  que habían estado en oscuridad, se les añadía 160  $\mu\text{l}$  de sulfanilamida al 1% en HCl 3N, para acidificar el medio y, posteriormente, 160  $\mu\text{l}$  de NNED 0,02% que proporcionaba un color rosado tras reaccionar con el nitrito en medio ácido. Tras 5 min, estas disoluciones resultantes se determinaron espectrofotométricamente a 546 nm en un lector de microplacas Power-Wave 340, BIO-TEK Instruments, Inc.

La recta de calibrado se construía con  $\text{KNO}_2$ , deshidratado durante 2h a  $85^\circ\text{C}$ , en un rango de concentraciones de 0 a 50  $\mu\text{M}$ , obteniéndose la siguiente ecuación de la recta:

$$\text{nmol KNO}_2/300 \mu\text{l extracto} = \text{Abs}_{546}/0,0947, \quad r^2 = 0,9994$$

El estado de activación se calculó dividiendo la actividad determinada en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  entre la actividad en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , y expresado en porcentaje (%), según [Agüera et al. \(2006\)](#).

### 2.6.2. Actividad Glutamina Sintetasa, GS

La actividad Glutamina Sintetasa (EC, 6.3.1.2, GS) se determinaba mediante una modificación del ensayo *in vitro* según Yamaya y Oaks (1988). El extracto enzimático se obtuvo homogeneizando en frío 0,1 g de material foliar, previamente congelado, en 1 ml de tampón de extracción: HEPES-KOH 50 mM pH 7,8; 2-Mercaptoetanol 10 mM;  $\text{MgCl}_2$  5 mM; DTT 5 mM; glicerol 20% y PVPP 0,6% (p/v). Posteriormente se centrifugaba el extracto durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  y 13.200 rpm.

La actividad GS se determinaba espectrofotométricamente a 540 nm, en un lector de microplacas, por aparición en el medio de  $\gamma$ -GHM. La determinación se realizó según [Lacuesta et al. \(1989\)](#) con algunas modificaciones. La concentración de los reactivos en el medio de reacción fue: HEPES-KOH 150 mM pH 7,8; hidroxilamina 10 mM; NaOH 10 mM; ATP 15 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; Na<sub>2</sub>-EDTA 2 mM y glutamato 150 mM, en un volumen final de 105  $\mu$ l. Es importante la neutralización de la hidroxilamina con el NaOH antes de la adición del resto de los componentes. La mezcla de ensayo se preincubaba durante 10 minutos a 35 °C, iniciándose la reacción con la adición de 45  $\mu$ l de extracto enzimático. La reacción tenía lugar durante 30 minutos, al cabo de los cuales se añadían 150  $\mu$ l de mezcla parado que contenía FeCl<sub>3</sub> 3,3% (p/v); TCA 8% (p/v) y HCl 2N. A los blancos se les añadía medio de reacción sin ATP. Al añadirse la mezcla de parado se precipitaba parte de la proteína, por lo que fue necesaria una segunda centrifugación durante 5 minutos a 30.000 g en una centrífuga KUBOTA 8100 con adaptadores para microplacas.

Para la valoración del resultado espectrofotométrico se realizaba una recta patrón con una solución de  $\gamma$ -GHM 4 mM en tampón HEPES-KOH 100 mM. Se preparó una batería de diluciones de 0 a 1000  $\mu$ M. La ecuación de la recta obtenida era:

$$\text{mM } \gamma\text{-GHM} = \text{Abs}_{540} / 5,0584, \quad r^2 = 0,9979$$

### **2.6.3. Actividad Glutamato Deshidrogenasa, GDH**

La obtención del extracto enzimático se realizaba como en el apartado 2.3.6.2. La actividad de NAD(H)-GDH (EC, 1.4.1.2. GDH) se determinaba esencialmente según el método descrito por [Loyola-Vargas y Sánchez de Jiménez \(1984\)](#) en ambas direcciones, aminante y desaminante.

#### **2.6.3.1. Actividad GDH aminante: GDH-NADH**

Para el ensayo en sentido aminante el extracto vegetal (20  $\mu$ l) se hacía reaccionar con 280  $\mu$ l de medio de ensayo: TRIS-HCl 100 mM pH 8; CaCl<sub>2</sub> 1 mM; (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> 50 mM;  $\alpha$ -cetoglutarato 13 mM y NADH 0,25 mM. Se preparaba un medio de reacción para los blancos sin NADH, y se incubaban todos ellos a 35 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se añadía el

extracto al medio de reacción. Se determinaba la desaparición de NADH midiendo la absorbancia a 340 nm cada 10 segundos durante 10 minutos.

La recta de calibrado se realizó a concentraciones de NADH entre 0-50 nmol, de manera que la ecuación de cálculo era:

$$\text{nmol NADH en el extracto} = \text{Abs}_{340} / 0,0169, \quad r^2 = 0,9999$$

### 2.6.3.2. Actividad GDH desaminante: GDH-NAD<sup>+</sup>

La actividad GDH en sentido desaminante tiene lugar cuando la planta está sometida a estrés. Dicho estrés provoca daños que modifican el pH celular basificándolo. La reacción se llevaba a cabo a pH 9 añadiendo 20 µl de extracto vegetal a 280 µl de medio de reacción que contenía: TRIS-HCl 100 mM; CaCl<sub>2</sub> 1 mM; NaGlu 35 mM y NAD 0,25 mM. El medio de reacción para los blancos no contenía NaGlu. Se determinó la misma cinética que en sentido aminante, pero en este caso detectando la aparición de NADH.

La recta de calibrado se realizó a concentraciones de NADH entre 0-50 nmol, de manera que la ecuación de cálculo era:

$$\text{nmol NADH en el extracto} = \text{Abs}_{340} / 0,0169, \quad r^2 = 0,9999$$

## 2.7. Cuantificación de proteína soluble

La cuantificación de las proteínas solubles se llevaba a cabo siguiendo el método propuesto por [Bradford \(1976\)](#). El extracto utilizado era el correspondiente al de cada determinación enzimática. Se añadían 20 µl de extracto vegetal a 580 µl de solución Bradford diluida: 1,4 ml de Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent concentrate (BIO-RAD Laboratories GMBH, Munich, Alemania) diluidos en 4,6 ml de agua desionizada. Se dejaba reaccionar durante 10 minutos en oscuridad y se procedía a medir espectrofotométricamente la absorbancia a 595 nm. El blanco se obtenía añadiendo el medio de extracción correspondiente en lugar de extracto enzimático.

La recta de calibrado se realizaba utilizando seroalbúmina bovina (Sigma) como patrón, en un intervalo de concentraciones de calibrado de 0-350 µg/ml de extracto, obteniéndose la siguiente recta de calibrado:

$$\text{Proteína soluble } (\mu\text{g/ml extracto}) = (\text{Abs}_{595} - 0,0122) / 0,0011, \quad r^2 = 0,9961$$



## 2.8. Extracción y determinación de pigmentos fotosintéticos

Para la determinación del contenido en clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides (carotenos y xantofilas) se extrajeron los pigmentos en DMSO según una modificación del método propuesto por [Barnes et al. \(1992\)](#). Se colocaban dos discos foliares de 5 mm de diámetro en un microtubo con 2 ml de DMSO y permanecían 2 horas en la estufa a 80 °C. Transcurrido ese tiempo, se sacaban de la estufa y, una vez que el extracto alcanzaba la T<sup>a</sup> ambiente, se medía la absorbancia en un espectrofotómetro a 4 longitudes de onda diferentes: 665 y 649 nm, picos máximos de absorbancia de las clorofila *a* y clorofila *b*, respectivamente (región roja del espectro visible), 480 nm, pico máximo de absorbancia para los carotenoides (región azul del espectro visible) y 750 nm para asegurar que la turbidez del extracto fuera inapreciable (región del rojo lejano en el espectro visible). En el caso de obtenerse valores de absorbancia a 750 nm mayores de 0,005, el dato obtenido debía ser restado al dato de las demás absorbancias (480, 649 y 665) de la misma muestra ([Lacuesta, 1992](#)). La concentración de los pigmentos se calculaba mediante las siguientes fórmulas:

Clorofila *a* ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ):  $12,47 \text{ Abs}_{665} - 3,62 \text{ Abs}_{649}$

Clorofila *b* ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ):  $25,06 \text{ Abs}_{649} - 6,50 \text{ Abs}_{665}$

Carotenos + Xantofilas ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) =  $[1000 \text{ Abs}_{480} - 1,29 \text{ Chl } a - 53,78 \text{ Chl } b]/220$

## 2.9. Parámetros de crecimiento

### 2.9.1. Parámetros absolutos

Se analizaron diversos parámetros relacionados con el crecimiento de las plantas. Así, se determinaron el número de hojas, el peso fresco (PF) y peso seco (PS) tanto foliares como de la raíz, el área foliar (medidor de área Portable Area Meter LI-COR Model LI-3000A) y el volumen de la raíz.

### 2.9.2. Parámetros relativos

A partir de los pesos secos y las áreas obtenidas se calcularon los siguientes parámetros relativos de crecimiento según [Poorter \(1989\)](#), [Pérez de Juan \(1996\)](#) y [Usuda \(2004\)](#), donde  $W_1$  y  $W_2$  son el peso seco total de la planta,  $L_1$  y  $L_2$  el área total de las hojas, y

$LW_1$  y  $LW_2$  el peso seco total de las hojas en los tiempos  $t_1$  (inicial) y  $t_2$  (final), respectivamente.

- Tasa de crecimiento relativo (RGR)

Se define como la tasa de incremento de masa instantánea en relación a la cantidad de masa de planta preexistente. Se calculó mediante:

$$\text{RGR (g PS g}^{-1} \text{ PS día}^{-1}) = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1)$$

- Tasa de asimilación neta (NAR)

La tasa de crecimiento relativo, RGR, viene determinada por la tasa de asimilación neta (NAR) y la relación área foliar frente al peso seco de la planta (LAR). NAR es una medida de la eficiencia de los órganos asimilatorios en producir nueva materia y suele venir delimitada por los componentes funcionales de la planta. Se calculó mediante:

$$\text{NAR (g PS m}^{-2} \text{ día}^{-1}) = (W_2 - W_1)(\ln L_2 - \ln L_1) / (t_2 - t_1)(L_2 - L_1)$$

- Relación de área foliar (LAR)

Normalmente, se descompone en dos términos: la relación de peso foliar (LWR) que es la relación de peso foliar frente a la biomasa total y el área foliar específica (SLA) que es la relación entre el área y la biomasa seca foliar. El producto de LWR y SLA nos da el referido LAR.

El LAR es la relación entre el área foliar y el peso seco total de la planta y refleja el tamaño de la superficie fotosintética en relación a la biomasa respiratoria total. Suele venir limitada por el componente morfológico de las hojas. Se calcula:

$$\text{LAR (m}^2 \text{ kg}^{-1} \text{ PS)} = (L_2 - L_1)(\ln W_2 - \ln W_1) / (\ln L_2 - \ln L_1)(W_2 - W_1)$$

LWR es la fracción de la masa total invertida en hojas

$$\text{LWR (g PS g}^{-1} \text{ PS)} = (\text{LW}_2 - \text{LW}_1)(\ln W_2 - \ln W_1) / (\ln \text{LW}_2 - \ln \text{LW}_1)(W_2 - W_1)$$

SLA es la relación entre el área foliar y el peso foliar

$$\text{SLA (m}^2 \text{ g}^{-1} \text{ PS)} = (\text{L}_2 - \text{L}_1)(\ln \text{LW}_2 - \ln \text{LW}_1) / (\ln \text{L}_2 - \ln \text{L}_1)(\text{LW}_2 - \text{LW}_1)$$

## 2.10. Tratamiento estadístico

Los análisis estadísticos se efectuaron utilizando el paquete informático SPSS versión 16.0 (Chicago, IL). Los datos se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) de tres vías para determinar los principales efectos del tiempo, concentración de CO<sub>2</sub> y estrés hídrico en todas las variables dependientes. Las interacciones entre las principales variables independientes también fueron analizadas. A la hora de tratar y comparar los tratamientos fue aplicado el test de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas para un valor de  $P \leq 0,05$ .

# TERCER CAPÍTULO

## RELACIONES HÍDRICAS\*

### 3.1. Introducción y objetivos

### 3.2. Resultados

#### 3.2.1. Contenido hídrico relativo de suelo y foliar

#### 3.2.2. Potencial hídrico, osmótico y de pared

#### 3.2.3. Potencial osmótico a máxima turgencia y ajuste osmótico

#### 3.2.4. Transpiración en planta entera

#### 3.2.5. Conductancia hidráulica

#### 3.2.6. Conductividad electrolítica

### 3.3. Discusión

### 3.4. Conclusiones

\*Datos parcialmente publicados en Robredo *et al.*, *Environmental and Experimental Botany*, 59: 252-263 (2007).



### 3.1. Introducción y objetivos

Los efectos secundarios que el aumento de CO<sub>2</sub> atmosférico puede ocasionar en el crecimiento y la fisiología de las plantas no han sido totalmente elucidados. Debemos estudiar cómo estas respuestas son modificadas por factores como la sequía, la limitación de nitrógeno y otros estreses ambientales. Los conocimientos actuales sobre la interacción entre el aumento de CO<sub>2</sub> y el estrés hídrico son insuficientes para predecir el impacto del cambio climático en el crecimiento de las plantas y su producción (Luo y Mooney, 1999). Además, los mecanismos de esta interacción no están completamente aclarados. Es un hecho conocido que el aumento de biomasa (Rogers et al., 1984; Curtis y Wang, 1998) y las modificaciones de la fotosíntesis y de las relaciones hídricas (Gunderson y Wullschleger, 1994; Saxe et al., 1998) causadas por el elevado CO<sub>2</sub> son dependientes de la disponibilidad de otros recursos limitantes (Long, 1991; Chaves y Pereira, 1992; Field et al., 1992; Stitt y Krapp, 1999). De entre tales recursos, el agua se considera como el principal factor limitante para el crecimiento y la productividad (Schulze et al., 1987). Por tanto, la interacción entre el elevado CO<sub>2</sub> y el agua del suelo es un aspecto importante en la fisiología de la planta (Wullschleger et al., 2002) bajo las condiciones climáticas futuras.

El aumento de CO<sub>2</sub> podría causar un calentamiento global así como cambios en los patrones de precipitación (Kimball et al., 2001). Así, las lluvias aparecerían más frecuentemente de manera intensa y errática, pudiendo también afectar a regiones no sujetas habitualmente a precipitaciones como resultado de la concentración de los gases de efecto invernadero (Allen, 1994; Dirmeyer y Shukla, 1996; Centritto et al., 1999). En algunas regiones, tales como las latitudes del Mediterráneo, se espera, por contra, que aparezcan sequías más frecuentes y severas.

De aquí que parezca pertinente la cuestión planteada por Seneweera: ¿hasta qué punto el aumento de CO<sub>2</sub> podría afectar a la productividad en condiciones de sequía? (Seneweera et al., 2001). Algunos estudios han mostrado que las plantas en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> se secan más lentamente a medida que el agua escasea, hecho que coincide con una menor conductancia estomática y una menor tasa de transpiración (Bunce, 1998).

Se ha sugerido que el elevado CO<sub>2</sub> podría aumentar la tolerancia a la sequía disminuyendo el potencial osmótico y por tanto manteniendo un  $\Psi_w$  más alto (Tyree y Alexander, 1993). El potencial osmótico descendería más rápidamente a elevada [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental y, consecuentemente, la presión de turgencia se mantendría, permitiendo que

el crecimiento continuase a medida que el déficit hídrico aumentara (Sionit et al., 1980). Además, las plantas creciendo en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> pueden necesitar menos agua, utilizándola más eficientemente y siendo por tanto capaces de tolerar la sequía mejor en algunas situaciones (Vu et al., 1998). Por otro lado, la deshidratación del suelo en el entorno del sistema radical podría aparecer en una menor tasa que en las plantas que crecen a CO<sub>2</sub> ambiental (Polley et al., 1994; Grossman-Clarke et al., 2001).

Al ser la sequía uno de los principales factores limitantes para el crecimiento y la productividad de los cultivos (Araus et al., 2002; Chaves, 2002), su efecto en el caso de los cereales hace que se ponga en peligro la supervivencia de la planta si la restricción de agua aparece durante el periodo de crecimiento vegetativo (Volaire, 2003). Sin embargo, las plantas son capaces de adaptarse a la deficiencia hídrica acortando su ciclo de crecimiento o bien desarrollando la capacidad de evitar la sequía aumentando el crecimiento radical, lo que aumentaría la toma de agua por las raíces (Molnár et al., 2004).

La cebada es uno de los cereales más cultivados en la región del Mediterráneo y aunque la sequía reduce su productividad (Lopes et al., 2004) es, de entre los principales cereales cultivados en clima templado, uno de los mejores adaptados a la restricción hídrica (Sánchez-Díaz et al., 2002). No obstante, son pocos los estudios que han señalado los efectos concurrentes del elevado CO<sub>2</sub> y la sequía en las relaciones hídricas de cebada (Benavides, 2002).

En base a este marco teórico y partiendo de la hipótesis de que el elevado CO<sub>2</sub> modifica la respuesta de las relaciones hídricas, se plantean los siguientes objetivos:

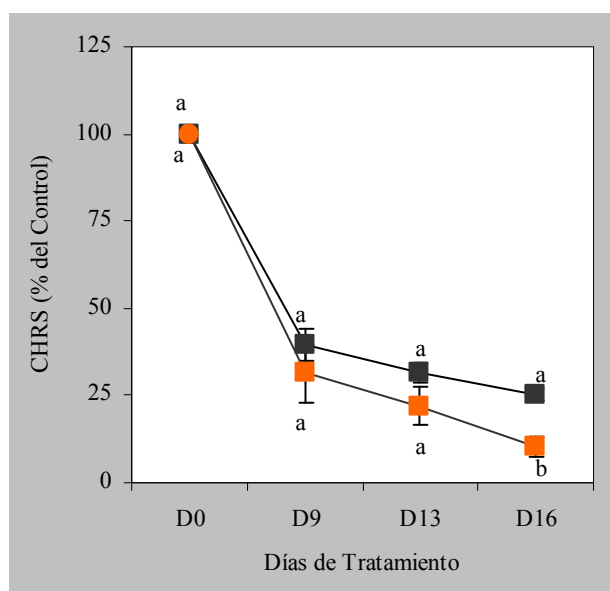
- Determinar el balance hídrico en el suelo y la planta en condiciones de sequía o riego bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental y elevada.
- Comprobar si existe ajuste osmótico como factor de aclimatación en respuesta al estrés hídrico y averiguar si el alto CO<sub>2</sub> desempeña un papel modificador de dicha aclimatación.
- Analizar la capacidad de las plantas para recuperarse del estrés, tanto bajo condiciones de [CO<sub>2</sub>] ambiental como de elevada [CO<sub>2</sub>].

Para alcanzar estos objetivos se llevaron a cabo las siguientes determinaciones. En primer lugar, se evaluó el contenido hídrico relativo del suelo y de la planta. En segundo lugar, se analizaron los potenciales hídrico, osmótico y de pared, así como el potencial osmótico a máxima turgencia y el posible ajuste osmótico. Por último, se calculó la transpiración por planta entera, la conductancia hidráulica y la conductividad electrolítica.

## 3.2. Resultados

### 3.2.1. Contenido hídrico relativo de suelo, CHRS y foliar, CHR

Durante el periodo de 16 días de sequía, el CHRS se redujo en un 88% en las plantas cultivadas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental y un 75% en las de elevada  $[\text{CO}_2]$ , por tanto, la tasa de uso de agua fue diferente ( $P \leq 0,01$ ) entre los tratamientos de  $\text{CO}_2$  (Fig. 3.1). El CHRS disminuyó más lentamente en las plantas de elevada  $[\text{CO}_2]$ , de forma que, después de 9 días de sequía, el contenido hídrico del suelo se redujo un 69% a  $[\text{CO}_2]$  ambiental, mientras que a elevada  $[\text{CO}_2]$  se alcanzó una reducción similar después de 13 días sin riego.



| Parámetro | $\text{CO}_2$ | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | $\text{CO}_2 \times \text{T.e.t.}^1$ | $\text{CO}_2 \times \text{Sequía}$ | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | $\text{CO}_2 \times \text{T.e.t.}^1 \times \text{Sequía}$ |
|-----------|---------------|---------------------|--------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|---|
| CHRS      | **            | *                   | ***    | n.s.                                 | *                                  | **                           | n.s.  |

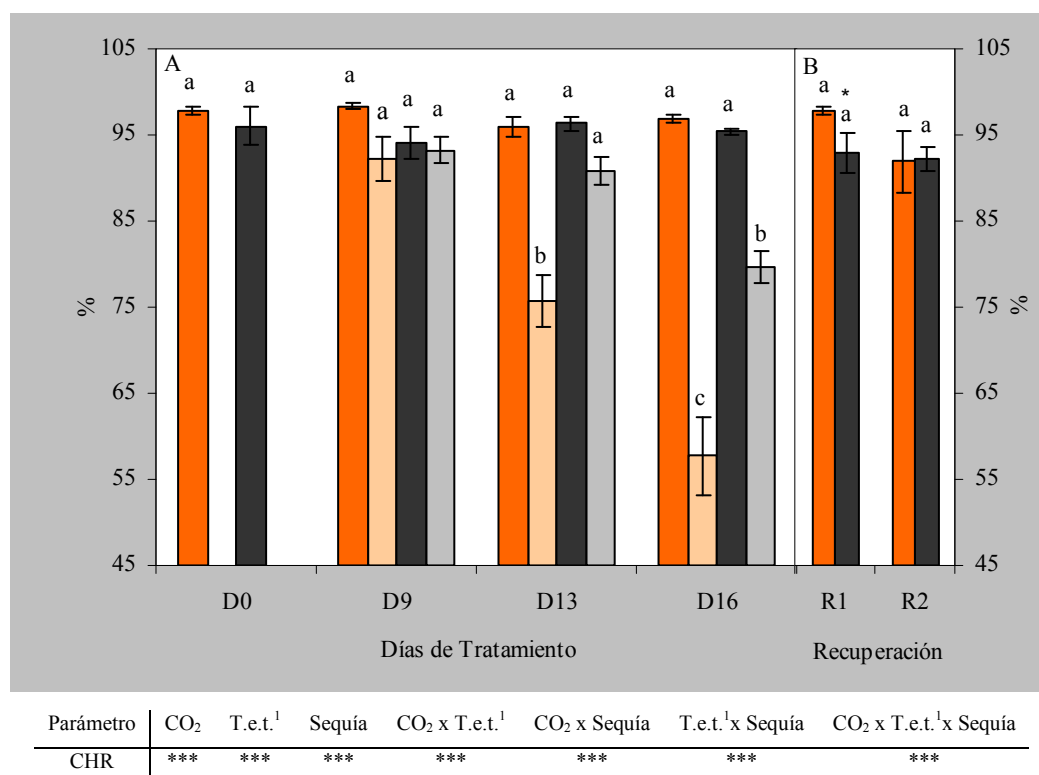
El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento.

**Fig. 3.1.** Cambios a lo largo del tiempo del CHRS de plantas de cebada en sequía en condiciones de  $\text{CO}_2$  ambiental (símbolos naranjas) o elevado (símbolos grises). D0 representa plantas bien regadas (círculos), y D9, D13 y D16 representan las sequías (cuadrados) durante 9, 13 y 16 días, respectivamente. Los valores son la media  $\pm$  ES de al menos tres experimentos, repetido cada uno de ellos tres veces. Dentro del mismo periodo de medida, las diferencias significativas vienen representadas por diferentes letras ( $P \leq 0,05$ ).

El CHR de la hoja (Fig. 3.2) se vio influenciado significativamente por la  $[\text{CO}_2]$  y por la disponibilidad hídrica. Así, el CHR de las plantas regadas, tanto a  $[\text{CO}_2]$  ambiental como a elevada  $[\text{CO}_2]$ , permaneció constante con valores relativamente altos (97% a  $[\text{CO}_2]$  ambiental



y 95% a elevada  $[\text{CO}_2]$ ) durante todo el periodo experimental (Fig. 3.2). Por otro lado, las plantas sujetas a sequía progresiva presentaron un comportamiento diferente dependiendo de la  $[\text{CO}_2]$ . En las plantas de  $[\text{CO}_2]$  ambiental el CHR disminuyó un 6%, 21% y 40% después de 9, 13 y 16 días de sequía, respectivamente. En plantas crecidas a elevada  $[\text{CO}_2]$  el CHR permaneció prácticamente constante (reducción de 4% a 6%) incluso tras 13 días en sequía, disminuyendo un 16% tras 16 días de sequía (Fig. 3.2A). De esta forma, se observó que el CHR a elevado  $\text{CO}_2$  nunca fue menor del 80%. Esto es, las plantas sometidas a sequía mantuvieron mayor CHR a elevado  $\text{CO}_2$  en comparación con las plantas de  $[\text{CO}_2]$  ambiental ( $P \leq 0,001$ ).

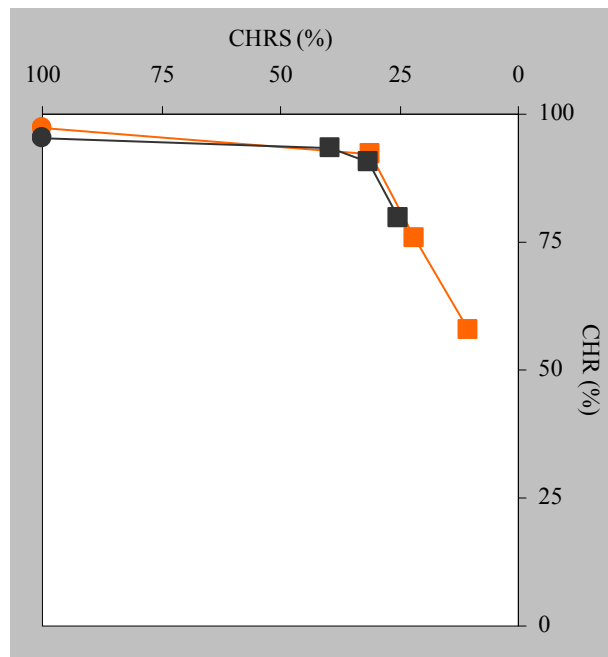


El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento

**Fig. 3.2.** **A)** Interacción a lo largo del tiempo de la disponibilidad hídrica y la concentración de  $\text{CO}_2$  en el CHR de la hoja. **B)** Recuperación hídrica durante 7 (R1) y 3 días (R2) de las plantas sometidas a sequía durante 9 y 13 días, respectivamente. Barras naranjas oscuro representan plantas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental y riego, barras en negro representan elevada  $[\text{CO}_2]$  y riego; barras en naranja claro,  $[\text{CO}_2]$  ambiental y sequía, y barras grises, elevada  $[\text{CO}_2]$  y sequía. El \* indica diferencias significativas a  $P \leq 0,05$  entre los tratamientos de  $\text{CO}_2$ . Condiciones de crecimiento y análisis estadístico como en Fig. 3.1.

Tras el riego y en los dos tratamientos de  $\text{CO}_2$ , el CHR alcanzó valores prácticamente similares a los del control tras 3-7 días del restablecimiento del aporte de agua (Fig. 3.2B).

Relacionando el CHRS con el CHR (Fig. 3.3) se observan niveles de contenido hídrico foliar similares a niveles hídricos de suelo similares bajo ambas concentraciones de  $\text{CO}_2$ . Esto aparece al coincidir el CHR de plantas del día 13 en elevado  $\text{CO}_2$  con el CHR de plantas del día 9 bajo  $\text{CO}_2$  ambiental. Cuando en el suelo hay un contenido hídrico del 31%, las plantas de elevado  $\text{CO}_2$  que llevan 13 días en sequía muestran un CHR cercano al 91%, en cambio, este CHR es similar al de plantas de  $\text{CO}_2$  ambiental que llevan 9 días en sequía, cuatro días en sequía menos que las de elevado  $\text{CO}_2$ .



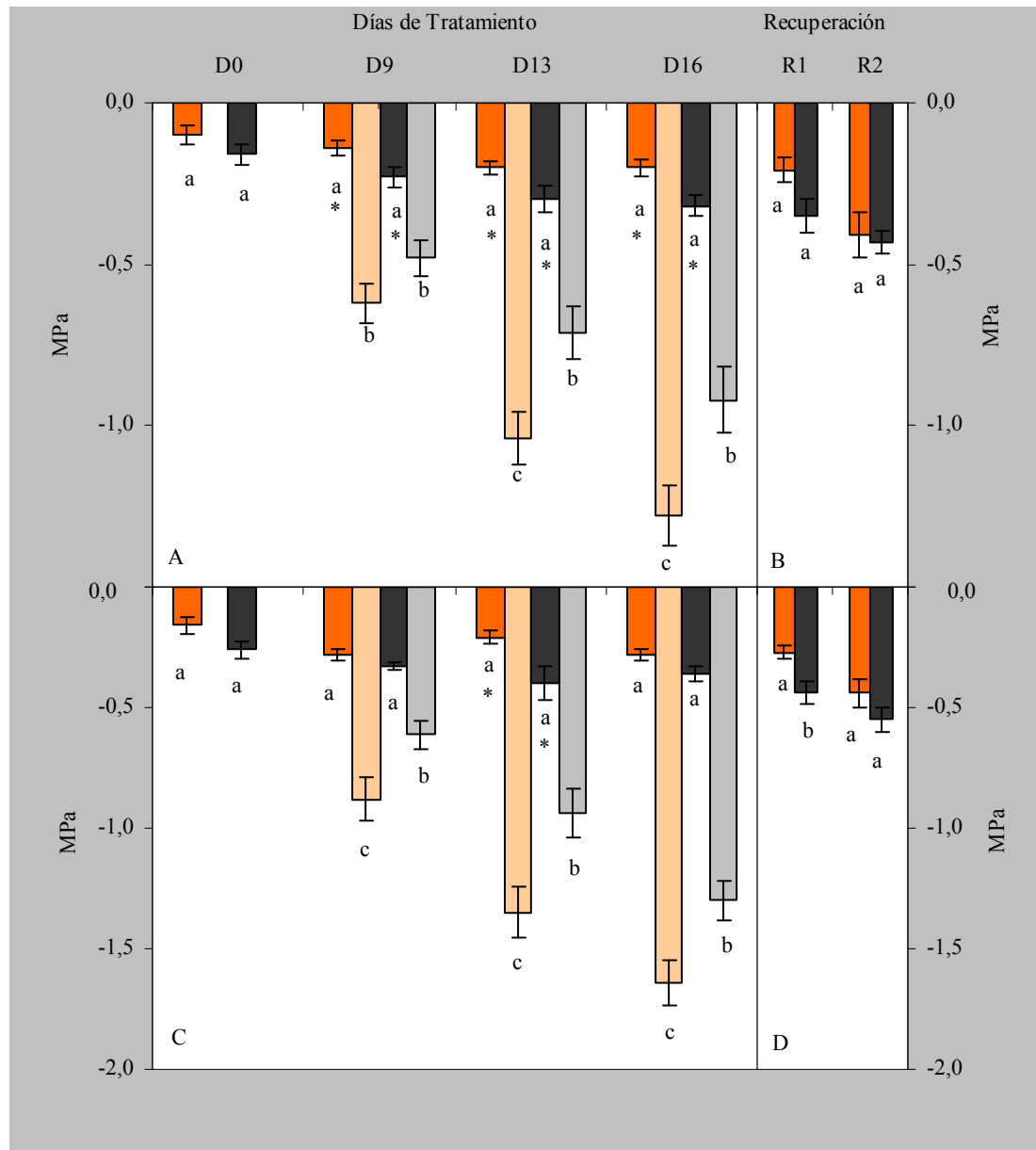
**Fig. 3.3.** Relación entre el CHRS y el CHR de plantas crecidas a  $\text{CO}_2$  ambiental (naranja) o elevado (negro). Los círculos representan plantas en riego al inicio del estudio y los cuadrados representan plantas en sequía progresiva durante 9, 13 ó 16 días.

### 3.2.2. Potencial hídrico, $\Psi_w$ , osmótico, $\Psi_o$ y de pared, $\Psi_p$

Las plantas en régimen de riego mostraron valores de  $\Psi_w$  ligeramente más negativos al mediodía,  $\Psi_{w_{md}}$  (Fig. 3.4C) que al amanecer,  $\Psi_{w_{pd}}$  (Fig. 3.4A). Esto es, se observaron valores de  $\Psi_{w_{pd}}$  de  $-0,16\text{MPa}$  y de  $\Psi_{w_{md}}$  de  $-0,23\text{MPa}$  a  $\text{CO}_2$  ambiental y, por otro lado,  $-0,25\text{MPa}$  de  $\Psi_{w_{pd}}$  y  $-0,34\text{MPa}$  de  $\Psi_{w_{md}}$  a  $\text{CO}_2$  elevado, de media y a lo largo de todo el estudio.

En condiciones de sequía el  $\Psi_{w_{pd}}$  se fue haciendo mas negativo alcanzándose valores que declinan hasta  $-1,28\text{MPa}$  y  $-0,92\text{MPa}$ , a  $\text{CO}_2$  ambiental y  $\text{CO}_2$  elevado. El  $\Psi_{w_{md}}$ , cuando

las plantas fueron sometidas a sequía, cayó hasta  $-1,64\text{MPa}$  y  $-1,29\text{MPa}$  a  $[\text{CO}_2]$  ambiental y elevada, respectivamente.



| Parámetro        | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|------------------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| Ψ <sub>Wpd</sub> | **              | ***                 | ***    | n.s.                                  | ***                      | ***                          | n.s.   |
| Ψ <sub>Wmd</sub> | **              | ***                 | ***    | n.s.                                  | ***                      | ***                          | n.s.   |

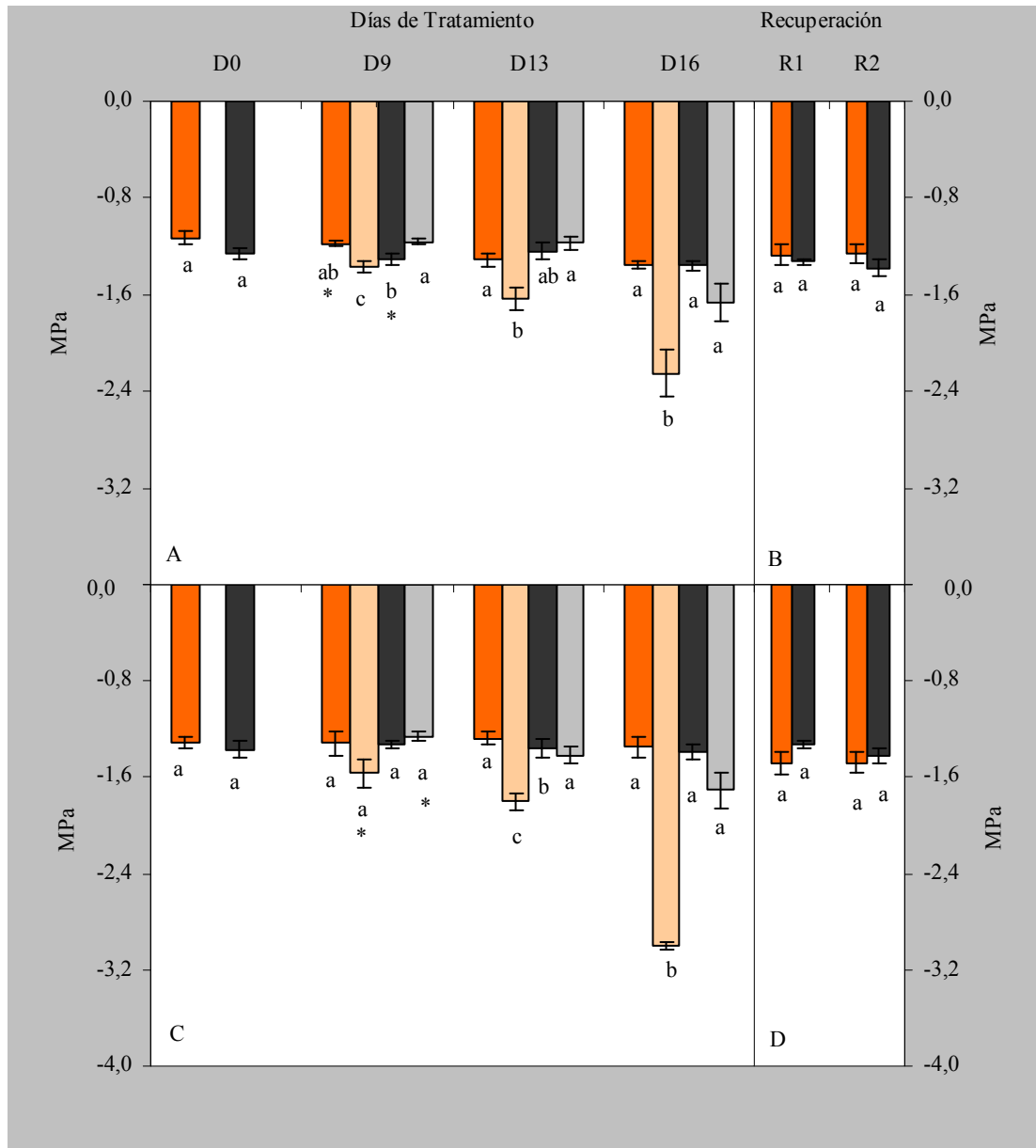
El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento

**Fig. 3.4.** Interacción a lo largo del tiempo de la disponibilidad hídrica y la concentración de  $\text{CO}_2$  en el potencial hídrico al amanecer,  $\Psi_{Wpd}$  (A) y al mediodía,  $\Psi_{Wmd}$  (C). Recuperación hídrica del  $\Psi_{Wpd}$  (B) y del  $\Psi_{Wmd}$  (D) de las plantas sometidas a sequía. Condiciones de crecimiento y análisis estadístico como en Fig. 3.2.

Al comparar la diferencia de  $\Psi_{w_{md}}$  entre el comienzo y el final del periodo de sequía, éste descendió un 26% más a  $[CO_2]$  ambiental que a elevada  $[CO_2]$ . Si comparamos el tiempo de exposición al tratamiento de plantas con similar  $\Psi_{w_{md}}$  (aprox.  $-1,35MPa$ ) a  $[CO_2]$  ambiental y elevada  $[CO_2]$  observamos que las plantas de  $[CO_2]$  ambiental alcanzan dicho potencial 3-4 días antes que las plantas de elevada  $[CO_2]$ . Por lo tanto, en plantas de elevada  $[CO_2]$  apareció un retraso de 3-4 días con respecto a las de  $[CO_2]$  ambiental. Tras restablecer el riego el  $\Psi_w$  alcanzó valores cercanos al control tras 3-7 días de recuperación (Fig. 3.4B y 3.4D).

En las plantas regadas, el  $\Psi_o$  (Fig. 3.5) permaneció entre  $-1,24MPa$  (amanecer,  $\Psi_{o_{pd}}$ ) y  $-1,31MPa$  (mediodía,  $\Psi_{o_{md}}$ ) a  $[CO_2]$  ambiental, y entre  $-1,32MPa$  ( $\Psi_{o_{pd}}$ ) y  $-1,42MPa$  ( $\Psi_{o_{md}}$ ) a elevada  $[CO_2]$  a lo largo del experimento. Sin embargo, el  $\Psi_o$  de las plantas de sequía se vio significativamente influenciado por el  $CO_2$  ( $P \leq 0,01$ ). Así, los potenciales osmóticos al amanecer y al mediodía disminuyeron como resultado del estrés hídrico. En plantas de  $[CO_2]$  ambiental el  $\Psi_{o_{pd}}$  disminuyó hasta  $-2,25MPa$  (Fig. 3.5A) tras 16 días de ausencia de riego, descenso que se mostró más acentuado al mediodía,  $-3,00MPa$  (Fig. 3.5B). Para el mismo periodo de sequía a elevada  $[CO_2]$  se observaron valores menos negativos en ambos potenciales osmóticos:  $-1,67MPa$  para el  $\Psi_{o_{pd}}$  (Fig. 3.5A) y  $-1,71MPa$  para el  $\Psi_{o_{md}}$  (Fig. 3.5B).

El  $\Psi_o$  se recuperó hasta valores cercanos a los de las plantas control una vez restablecido el riego, indicando la reversibilidad de los efectos ocasionados por el periodo de ausencia de riego (Fig. 3.5B y 3.5D).



| Parámetro        | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|------------------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| Ψ <sub>0pd</sub> | ***             | ***                 | ***    | n.s.                                  | ***                      | ***                          | n.s.   |
| Ψ <sub>0md</sub> | ***             | ***                 | ***    | *                                     | ***                      | ***                          | n.s.   |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento

**Fig. 3.5.** Interacción a lo largo del tiempo de la disponibilidad hídrica y la concentración de CO<sub>2</sub> en el potencial osmótico al amanecer, Ψ<sub>0pd</sub> (A), y al mediodía, Ψ<sub>0md</sub> (C). Recuperación del Ψ<sub>0pd</sub> (B), y del Ψ<sub>0md</sub> (D) de las plantas sometidas a sequía. Condiciones de crecimiento y análisis estadístico como en Fig. 3.2.

Tanto el potencial de pared medido al amanecer, Ψ<sub>p</sub> (  $P \leq 0,05$ ), como el medido al mediodía, Ψ<sub>p</sub> (  $P \leq 0,01$ ) se vieron afectados significativamente por la [CO<sub>2</sub>] y también por la sequía (  $P \leq 0,001$ ). Los Ψ<sub>p</sub> y Ψ<sub>p</sub> disminuyeron por efecto de la sequía hasta el día 13

en ambas concentraciones de CO<sub>2</sub> (Tabla 3.1). Por el contrario, en el día 16 se observó una reversión en ambos potenciales debido al valor tan negativo del  $\Psi_o$  a [CO<sub>2</sub>] ambiental. Por otro lado, al analizar las diferencias debidas a la concentración de CO<sub>2</sub>, a elevada [CO<sub>2</sub>] se observó como el  $\Psi_{p_{md}}$  seguía disminuyendo incluso en los 16 días de sequía, hasta un 60%. Al analizar estadísticamente la posible interacción entre el CO<sub>2</sub> y la sequía no se observaron efectos significativos sobre el  $\Psi_p$ .

**Tabla 3.1.** Potencial de pared al amanecer ( $\Psi_{p_{pd}}$ ) y potencial de pared al mediodía ( $\Psi_{p_{md}}$ ). Los valores son para plantas creciendo en riego (C), en sequía progresiva (S) durante 9, 13 ó 16 días y en recuperación, donde R1 es la recuperación de la sequía de 9 días (7 días de riego) y R2 es la recuperación de la sequía de 13 días (3 días de riego). Cada valor es la media  $\pm$  ES de al menos tres experimentos independientes, cada uno repetido tres veces. Dentro del mismo día de medida, las letras indican diferencias significativas a  $P \leq 0,05$ .

| Días Riego | $\Psi_p$ pd       |                   | $\Psi_p$ md       |                    |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
|            | 350               | 700               | 350               | 700                |
| <b>0</b> C | 1,03 $\pm$ 0,04 a | 1,10 $\pm$ 0,04 a | 1,15 $\pm$ 0,04 a | 1,11 $\pm$ 0,06 a  |
| <b>9</b>   | C                 | 1,04 $\pm$ 0,03 a | 1,08 $\pm$ 0,04 a | 1,04 $\pm$ 0,06 a  |
|            | S                 | 0,75 $\pm$ 0,05 b | 0,68 $\pm$ 0,04 b | 0,69 $\pm$ 0,10 bc |
| <b>13</b>  | C                 | 1,11 $\pm$ 0,04 a | 0,94 $\pm$ 0,06 a | 1,07 $\pm$ 0,04 a  |
|            | S                 | 0,59 $\pm$ 0,09 b | 0,46 $\pm$ 0,07 b | 0,45 $\pm$ 0,09 b  |
| <b>16</b>  | C                 | 1,15 $\pm$ 0,03 a | 1,04 $\pm$ 0,04 a | 1,07 $\pm$ 0,06 b  |
|            | S                 | 0,97 $\pm$ 0,14 a | 0,75 $\pm$ 0,13 a | 1,00 $\pm$ 0,06 b  |
|            | R1                | 1,06 $\pm$ 0,06 a | 0,98 $\pm$ 0,04 a | 1,21 $\pm$ 0,06 b  |
|            | R2                | 0,85 $\pm$ 0,08 a | 0,95 $\pm$ 0,05 a | 1,04 $\pm$ 0,07 b  |

| Parámetro       | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|-----------------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| $\Psi_{p_{pd}}$ | *               | *                   | ***    | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |
| $\Psi_{p_{md}}$ | **              | n.s.                | ***    | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | **   |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo

<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento

Tras restablecer el riego los valores alcanzaron y/o sobrepasaron sus valores control (Tabla 3.1).

### 3.2.3. Potencial osmótico a máxima turgencia, $\Psi_o^{100}$ y ajuste osmótico, AO

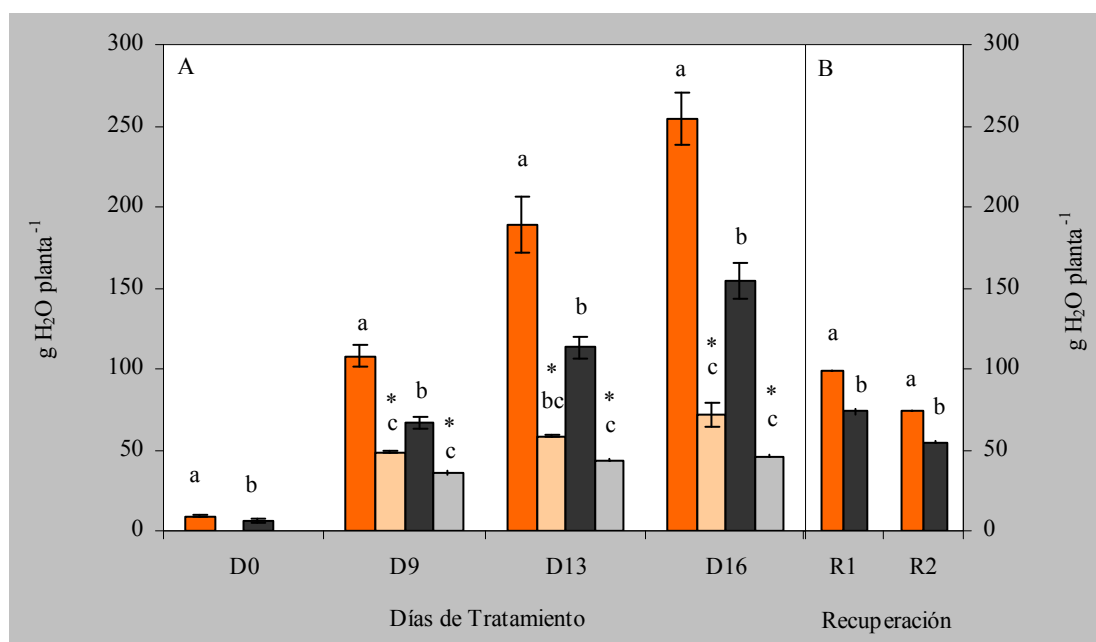
Se puede apreciar un ajuste osmótico diurno, como se deduce de la tendencia negativa en el  $\Psi_o$  medido del amanecer al mediodía ( $\Psi_{o_{md}} - \Psi_{o_{pd}}$ ) bajo ambas concentraciones de  $CO_2$  y régimen hídrico (Fig. 3.5). Sin embargo, no se observa AO en las plantas a bajo o alto  $CO_2$  a lo largo del experimento, ya que no hubo diferencias significativas en el  $\Psi_o^{100}$  (Tabla 3.2) entre las plantas regadas y las sometidas a estrés.

**Tabla 3.2.** Potencial osmótico ( $\Psi_o^{100}$ ) y ajuste osmótico (AO) a máxima turgencia. Plantas en condiciones de riego (Control) y estrés hídrico (Sequía) bajo diferentes concentraciones de  $CO_2$  atmosférico (350ppm = [ $CO_2$ ] ambiental; 700ppm = [ $CO_2$ ] elevada) a lo largo de los 16 días de experimento. Cada valor (MPa) es la media  $\pm$  ES de al menos tres experimentos independientes, cada uno repetido tres veces.

| Días | 350ppm           |                  | AO    | 700ppm           |                  | AO    |
|------|------------------|------------------|-------|------------------|------------------|-------|
|      | $\Psi_o^{100}$   |                  |       | $\Psi_o^{100}$   |                  |       |
|      | Control          | Sequía           |       | Control          | Sequía           |       |
| 0    | -1,25 $\pm$ 0,05 | -1,25 $\pm$ 0,05 | --    | -1,31 $\pm$ 0,08 | -1,31 $\pm$ 0,08 | --    |
| 9    | -1,29 $\pm$ 0,10 | -1,37 $\pm$ 0,04 | 0,08  | -1,23 $\pm$ 0,03 | -1,22 $\pm$ 0,05 | -0,01 |
| 13   | -1,35 $\pm$ 0,05 | -1,42 $\pm$ 0,10 | 0,07  | -1,50 $\pm$ 0,09 | -1,41 $\pm$ 0,06 | -0,09 |
| 16   | -1,43 $\pm$ 0,06 | -1,35 $\pm$ 0,08 | -0,08 | -1,31 $\pm$ 0,06 | -1,35 $\pm$ 0,18 | 0,04  |

### 3.2.4. Transpiración en planta entera, $T$

La transpiración acumulada por planta ( $T$ ) disminuyó en las plantas crecidas a elevada [ $CO_2$ ] y en riego en un 38% ( $P \leq 0,001$ ; Fig. 3.6). El estrés hídrico redujo la  $T$  en un 75% en plantas a [ $CO_2$ ] ambiental y en un 71% en plantas de elevada [ $CO_2$ ] ( $P \leq 0,001$ ). Se observó una recuperación parcial de  $T$  tras el restablecimiento del riego (Fig. 3.6B).



| Parámetro | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|-----------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| T         | ***             | ***                 | ***    | ***                                   | ***                      | ***                          | *  |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento

**Fig. 3.6.** Interacción a lo largo del tiempo de la disponibilidad hídrica y la concentración de CO<sub>2</sub> en la transpiración (*T*) por planta entera (A) y su recuperación (B). Condiciones de crecimiento y análisis estadístico como en Fig. 3.2.

### 3.2.5. Conductancia hidráulica, CH

La conductancia hidráulica fue significativamente ( $P \leq 0,001$ ) más baja (65%) a elevada [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental en condiciones óptimas de riego (Tabla 3.3) al inicio del estudio. Al analizar la CH durante todo el experimento, se observó que, a pesar de ser plantas regadas, la CH iba disminuyendo con la edad. Este descenso fue del 61% en plantas de [CO<sub>2</sub>] ambiental y del 55% en plantas de elevada [CO<sub>2</sub>].

Por otro lado, el efecto de la sequía fue también significativo ( $P \leq 0,001$ ) puesto que disminuyó en un 95% la conductancia hidráulica tras el periodo de sequía más prolongado, en ambos tratamientos de [CO<sub>2</sub>].



**Tabla 3.3.** Interacción entre la  $[\text{CO}_2]$  atmosférica y la disponibilidad hídrica en la conductancia hidráulica (CH). Los valores son para plantas creciendo en riego o en sequía progresiva durante 9, 13 ó 16 días. Las unidades para CH son:  $\text{gH}_2\text{O cm}^{-2} \text{ día}^{-1} \text{MPa}^{-1}$ . (350ppm =  $[\text{CO}_2]$  ambiental; 700ppm =  $[\text{CO}_2]$  elevada). Cada valor es la media  $\pm$  ES de al menos tres experimentos independientes, cada uno repetido tres veces. Dentro del mismo tratamiento y periodo de medida, las letras indican diferencias significativas a  $P \leq 0,05$ .

| Días | Control           |                   | Sequía             |                    |
|------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
|      | 350ppm            | 700ppm            | 350ppm             | 700ppm             |
| 0    | 4,27 $\pm$ 0,36 a | 1,53 $\pm$ 0,11 b | 4,27 $\pm$ 0,36 a  | 1,53 $\pm$ 0,11 b  |
| 9    | 2,92 $\pm$ 0,47 a | 0,72 $\pm$ 0,32 a | 0,28 $\pm$ 0,04 a  | 0,15 $\pm$ 0,00 a  |
| 13   | 2,30 $\pm$ 0,17 a | 0,72 $\pm$ 0,05 b | 0,146 $\pm$ 0,04 a | 0,069 $\pm$ 0,00 a |
| 16   | 1,66 $\pm$ 0,19 a | 0,68 $\pm$ 0,15 b | 0,093 $\pm$ 0,01 a | 0,026 $\pm$ 0,01 b |

| Parámetro | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|-----------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| CH        | ***             | ***                 | ***    | *                                     | ***                      | n.s.                         | *  |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo

<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento

### 3.2.6. Conductividad electrolítica foliar

No se observaron cambios en la conductividad electrolítica (Tabla 3.4) en plantas regadas por efecto de la  $[\text{CO}_2]$ . Sin embargo, sí se observó que la sequía provocaba un aumento ( $P \leq 0,001$ ) de la conductividad electrolítica del 81% tras 16 días de sequía a  $[\text{CO}_2]$  ambiental, y del 66% a elevada  $[\text{CO}_2]$ . Esto indica que la sequía modifica el estado de las membranas celulares, dependiendo de la duración de restricción hídrica a la que se sometan las plantas y dependiendo, así mismo, de la  $[\text{CO}_2]$  de la atmósfera.

**Tabla 3.4.** Interacción entre la [CO<sub>2</sub>] atmosférica y la disponibilidad hídrica en la conductividad electrolítica foliar (%). Los valores son para plantas creciendo en riego o en sequía progresiva durante 9, 13 ó 16 días. Cada valor es la media ± ES de al menos tres experimentos independientes, cada uno repetido tres veces. Dentro del mismo tratamiento hídrico y día de medida, las letras indican diferencias significativas a  $P \leq 0,05$ .

| Días | Control      |              | Sequía       |              |
|------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|      | 350ppm       | 700ppm       | 350ppm       | 700ppm       |
| 0    | 14,0 ± 0,45a | 13,8 ± 0,58a | 14,0 ± 0,45a | 13,8 ± 0,58a |
| 9    | 15,6 ± 0,71a | 15,4 ± 3,27a | 17,6 ± 1,34a | 16,1 ± 0,74a |
| 13   | 15,1 ± 0,95a | 20,0 ± 2,38b | 17,1 ± 0,56a | 19,9 ± 1,26b |
| 16   | 16,1 ± 1,33a | 14,3 ± 1,89a | 29,2 ± 2,41a | 23,8 ± 0,99b |

| Parámetro     | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|---------------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| Conductividad | n.s.            | ***                 | ***    | *                                     | n.s.                     | ***                          | n.s.   |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo

<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento

### 3.3. Discusión

Como han indicado [Samarakoon y Gifford \(1995\)](#) el contenido hídrico del suelo puede verse aumentado, disminuido o incluso no estar afectado, dependiendo de la relación entre el aumento del área foliar y el cierre estomático en respuesta al elevado CO<sub>2</sub>. En este trabajo se ha observado que durante el período de sequía, el elevado CO<sub>2</sub> retrasó en 3-4 días el agotamiento del contenido hídrico del suelo ( $P \leq 0,01$ ).

Esta menor tasa de desecación del suelo estaba en concordancia con menores tasas de transpiración en las plantas crecidas en elevado [CO<sub>2</sub>], aún cuando el área foliar era mayor que en las plantas crecidas a [CO<sub>2</sub>] ambiental. Se ha observado un mantenimiento similar del agua del suelo en otras especies como soja ([Rogers et al., 1984](#)), maíz ([Samarakoon y Gifford, 1995](#)) y arroz ([Vu et al., 1998](#)). Esta conservación podría ser suficiente para prolongar el período de fotosíntesis y crecimiento cuando el agua llega a ser limitante, como ha sido constatado por [Owensby et al. \(1997\)](#) y por [Wullschlegler y Norby \(2001\)](#). Otros autores muestran que la transpiración no varió por efecto de la [CO<sub>2</sub>], pero sí por el de la sequía, como citaron [Vivin y Guehl \(1997\)](#) en *Quercus robur*.

La mayor tasa de transpiración observada en plantas crecidas a [CO<sub>2</sub>] ambiental comparada con la de elevado CO<sub>2</sub>, tanto en condiciones de riego como de sequía, dio lugar a una disminución más rápida del contenido hídrico del suelo y, por lo tanto, a una mayor disminución del CHR foliar al final de cada uno de los períodos de sequía edáfica. Este mayor

uso del agua se asoció a una mayor  $g_s$ . Sin embargo, las plantas de cebada podían mantener un elevado CHR (76%) a pesar de que el  $\Psi_w$  disminuyó notablemente (-1,35MPa) trece días después de suprimir el riego. Esta capacidad de la cebada para mantener el CHR elevado con un decreciente  $\Psi_w$  se ha asociado a la resistencia de esta especie frente a la sequía moderada (Teulat et al., 1998). Carter et al. (1997) en *Lotus corniculatus* y Seneweera et al. (2001) en *Panicum coloratum* también observaron, como en nuestro trabajo, un CHR más alto en plantas de sequía creciendo a elevada  $[CO_2]$  que en  $[CO_2]$  ambiental. Sin embargo, como concluyeron Seneweera et al. (2001), apenas se observaron diferencias entre los tratamientos de  $CO_2$  cuando el CHR se expresaba en función del contenido hídrico del suelo. Así, durante un mismo período de sequía, el mejor mantenimiento del agua en el suelo causó un mayor contenido hídrico relativo foliar de plantas bajo elevado  $CO_2$  comparado con plantas que crecen a  $[CO_2]$  ambiental.

Este mejor estado hídrico en las plantas bajo sequía y elevado  $CO_2$  se vio acompañado por un  $\Psi_{w_{md}}$  más alto, momento en el que la fotosíntesis y la apertura estomática son máximas. Bajo condiciones de riego, las plantas mantenidas a concentración elevada de  $CO_2$  mostraron un  $\Psi_w$  levemente más bajo comparado con el de plantas a  $CO_2$  ambiental. Al contrario que en nuestros resultados, Vivin y Guehl (1997) observaron en *Quercus robur* que las plantas bien regadas mantenían un mismo  $\Psi_w$  al amanecer en ambas  $[CO_2]$ . La respuesta del  $\Psi_w$  al  $CO_2$  elevado en suelos bien regados es variable. Así, se han descrito potenciales más altos (Tognetti et al., 2000), invariables (Tognetti et al., 1998; Ferris y Taylor, 1994, 1995) y más bajos (Centritto et al., 1999; De Luis et al., 1999). La reducción de  $g_s$ , inducida por el elevado  $CO_2$ , podría ayudar a mantener un potencial hídrico más elevado. Sin embargo, la reducción de la conductancia hidráulica observada en nuestro trabajo podría compensar el efecto de los estomas y podría explicar, por lo menos parcialmente, el menor  $\Psi_w$  observado en plantas a elevado  $CO_2$ .

Por otro lado, la sequía provocaba diferentes efectos en las relaciones hídricas de las plantas dependiendo de la  $[CO_2]$  a la que crecían. Bajo elevada  $[CO_2]$ , el estrés hídrico apareció más lentamente; esta diferencia fue debida, sobre todo, a una tasa más lenta de desecación del suelo. Por tanto, el  $\Psi_w$  de las plantas crecidas a elevado  $CO_2$  y sometidas a 16 días de sequía fue entre 0,30-0,40MPa menos negativo que las mismas pero crecidas a  $CO_2$  ambiental. Patrones similares se han descrito en plantas de soja (Rogers et al., 1984) y en tres arbustos mediterráneos crecidos junto a una fuente natural de  $CO_2$  (Tognetti et al., 2000). Así, se ha propuesto que el  $CO_2$  elevado mejora, atenúa o compensa el impacto negativo de la

sequía en el crecimiento vegetal (Wullschleger et al., 2002) permitiendo a las plantas permanecer durante un período más largo turgentes y funcionales (Centritto et al., 1999). Además, se ha sugerido que las mayores tasas de asimilación de carbono observadas a elevado CO<sub>2</sub> (Fig. 4.1) pueden aumentar la tolerancia a la sequía debido a que la mayor disponibilidad del substrato puede disminuir el  $\Psi_o^{100}$ , permitiendo el ajuste osmótico (Wullschleger et al., 2002) y, de este modo, posibilita el mantenimiento de un mayor  $\Psi_w$  (Tyree y Alexander, 1993).

Sin embargo, aunque observamos una disminución del  $\Psi_o$  en las plantas sometidas a sequía a lo largo del ensayo, cuando se analizó el  $\Psi_o^{100}$ , no se observó un ajuste osmótico causado por el elevado CO<sub>2</sub>, ni en el tratamiento de riego ni en el de sequía. Así, a primera vista, la variación del  $\Psi_o$  podría deberse a la acumulación de solutos o a una disminución del contenido hídrico celular por deshidratación. Igualmente, el  $\Psi_o$  foliar no se vio afectado por el elevado CO<sub>2</sub> en plantas de arce, plátano americano y liquidámbar a pesar de un notable aumento en la tasa de asimilación de dióxido de carbono (Tschaplinski et al., 1995). Nuestros resultados, junto con los de Polley et al. (1999), Picon et al. (1996) y Tschaplinski et al. (1995), sugieren que el efecto del elevado CO<sub>2</sub> en el ajuste osmótico de Iranis es mínimo bajo condiciones de sequía. Por lo tanto, el mantenimiento de un potencial hídrico menos negativo en las plantas de elevado CO<sub>2</sub> sería una consecuencia del control estomático. Esta hipótesis parece tener más fuerza que la debida al ajuste osmótico.

Tanto en plantas regadas como en sequía, el elevado CO<sub>2</sub> causó una reducción del uso total de agua ( $T$ ). Este hallazgo está en contraposición con los resultados de otros autores que indican no haber observado efectos del CO<sub>2</sub> en el uso del agua, ni en plantas regadas ni en sometidas a sequía (Centritto et al., 1999; Picon et al., 1996), aunque hayan obtenido aumento en la  $EUA$ , como ha sucedido en cebada (Capítulo 4). Estos autores atribuyen el mayor uso del agua a una área foliar superior presentada por las plantas a elevada [CO<sub>2</sub>]. Samarakoon et al. (1995) también mostraron que plantas de trigo creciendo en suelos hidratados y alta [CO<sub>2</sub>] utilizaban menos agua. En suelos secos, estos autores observaron, como en nuestro estudio, que las plantas de elevado CO<sub>2</sub> utilizaban menos agua a pesar de mantener una mayor área foliar durante los primeros 30 días de restricción hídrica. En otros estudios también han mostrado un uso del agua considerablemente menor a elevado CO<sub>2</sub> (Owensby et al., 1997; Niklaus et al., 1998). Como consecuencia de este menor uso del agua a elevado CO<sub>2</sub> la hidratación del suelo se podría preservar durante un periodo de tiempo más largo (Field et al.,

1995), de este modo se pospondría la imposición de la sequía (Wullschleger et al., 2002) y se prolongaría el periodo de crecimiento de las plantas (Baker et al., 1997).

La conductancia hidráulica de la planta es consecuencia de la  $T$  y de la diferencia entre los potenciales hídricos de la planta, y se ha utilizado para analizar los cambios en el continuo suelo-planta-atmósfera. Nuestras plantas sujetas a sequía mostraron una reducción evidente en la conductancia hidráulica. También es conocido que el estrés hídrico reduce la conductancia hidráulica en especies como el álamo y el sauce (Johnson et al., 2002). Esta reducción ha sido atribuida al desarrollo de alteraciones en la anatomía o en la fisiología de la raíz incluyendo la embolia del xilema (Tyree et al., 1992), pérdida de raíces, cambios anatómicos en la ruta radial del agua, etc. (Trifilo et al., 2004). Por otro lado, la respuesta de la conductancia hidráulica al elevado  $\text{CO}_2$  es, al parecer, bastante variable (Wullschleger et al., 2002), pudiéndose observar desde aumentos hasta disminuciones e incluso no detectarse ningún cambio. En este estudio se muestra una disminución de la conductancia hidráulica en plantas crecidas a elevada concentración de  $\text{CO}_2$ , lo cual coincide con los resultados de Bunce (1996) en alfalfa y soja, así como con los resultados obtenidos por Pérez-López et al. (2009) en plantas de cebada de la misma variedad, Iranis. A este respecto, cuando el contenido hídrico del suelo no era limitado, aun cuando disminuía la conductancia estomática y la transpiración, nosotros no observamos ningún aumento en el potencial hídrico. Por el contrario, el potencial hídrico era más bajo en condiciones de elevado  $\text{CO}_2$ . Esta falta de aumento del potencial hídrico en suelos bien hidratados, cuando aparece junto a una reducción en la tasa de transpiración, implica una disminución de la conductancia hidráulica (Bunce y Ziska, 1998). Igualmente, en *Zea mays* y *Amaranthus retroflexus* se ha citado una reducción en la conductancia hidráulica (Bunce y Ziska, 1998). Bunce (1996) propuso la hipótesis de que una conductancia hidráulica más baja en condiciones de elevado dióxido de carbono podía ser debida a un ajuste homeostático para ajustar la conductancia hidráulica con la tasa de transpiración, la cual se veía reducida a elevada  $[\text{CO}_2]$ .

### 3.4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el elevado  $\text{CO}_2$  mejora el estado hídrico del suelo y de la planta en condiciones de sequía. El efecto del elevado  $\text{CO}_2$  sobre la disponibilidad del agua del suelo y sobre las relaciones hídricas de la planta se pueden resumir en lo siguiente:

- El elevado  $\text{CO}_2$  permite mantener un contenido hídrico del suelo mayor en condiciones de restricción hídrica. Esta mayor cantidad de agua edáfica y la menor transpiración que presenta la parte aérea aparentemente mejoran el potencial hídrico de la hoja, a pesar de que la conductancia hidráulica se vio reducida en las plantas creciendo bajo elevada  $[\text{CO}_2]$ .
- La baja tasa transpiratoria coadyuvó a mantener un mayor contenido hídrico foliar ya que también disminuyó considerablemente la transpiración total por planta, contribuyendo a una mayor eficiencia en el uso del agua, a pesar de que el  $\Psi_w$  disminuyó notablemente después de suprimir el riego. De este modo, durante un mismo período de sequía, el mayor contenido hídrico relativo foliar de plantas bajo elevado  $\text{CO}_2$  comparado con plantas que crecen a  $[\text{CO}_2]$  ambiental podría estar causado por un mejor mantenimiento del agua en el suelo y por las menores pérdidas transpiratorias, teniendo esta hipótesis más fuerza que la debida al ajuste osmótico.
- Las plantas mostraron recuperación en los parámetros hídricos analizados tras el riego después de haber permanecido en sequía, lo que mostró que el daño provocado por la sequía era reversible.
- Así, crecer las plantas bajo condiciones atmosféricas de elevado  $\text{CO}_2$  mitigaría o retrasaría los efectos negativos de la sequía en el estado hídrico de la cebada.



# CUARTO CAPÍTULO

## PROCESOS FOTOSINTÉTICOS\*

### 4.1. Introducción y objetivos

### 4.2. Resultados

#### 4.2.1. Fotosíntesis

4.2.1.1. Conductancia estomática, asimilación, concentración interna de CO<sub>2</sub> y transpiración instantánea. Eficiencia en el uso del agua

4.2.1.2. Rendimiento fotosintético y requerimiento cuántico

4.2.1.3. Aclimatación

4.2.1.4. Curvas *A/Ci*

4.2.1.5. Curvas *A/PPDF*

#### 4.2.2. Fluorescencia

#### 4.2.3. Pigmentos fotosintéticos

### 4.3. Discusión

4.3.1. Intercambio gaseoso

4.3.2. Aclimatación al CO<sub>2</sub>

4.3.3. Curvas *A/Ci*

4.3.4. Curvas *A/PPDF*

4.3.5. Fluorescencia y pigmentos

### 4.4. Conclusiones

\* Datos parcialmente publicados en Robredo *et al.*, Environmental and Experimental Botany, 52: 252-263 (2007) y en Robredo *et al.*, Biologia Plantarum 54: 285-292 (2010).





## 4.1. Introducción y objetivos

La fotosíntesis es un proceso fundamental para la vida puesto que representa el mecanismo mediante el cual se puede garantizar que la vida sobre la tierra no llegue a su fin por falta de energía. En esencia consiste en la liberación de oxígeno integrante de la molécula de agua y el almacenamiento del poder reductor y energía resultantes en numerosos compuestos carbonados que constituyen la materia viva. Se trata de captar la energía luminosa y transformarla en energía química (Barceló et al., 1992). Mediante la fotosíntesis, los organismos autótrofos, entre los que se incluyen las plantas, son capaces de servir de puerta de entrada a través de la cual la materia y la energía se incorporan a la biosfera (Medrano y Flexas, 2002).

El aumento en la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub> puede causar efectos pronunciados en la fotosíntesis y la producción de biomasa seca en plantas (Morison, 1985; Drake et al., 1997; Ward y Strain; 1999; Loewe et al., 2000). Sin embargo, generalmente la respuesta es alterada por los efectos de otros factores ambientales, tales como nutrientes minerales, estrés hídrico y temperatura (Baker, 1996). En el caso de los nutrientes, muchos estudios muestran que la limitación de los mismos reduce las respuestas de la fotosíntesis y del crecimiento a elevado CO<sub>2</sub> (Saxe et al., 1998).

Desde la introducción del modelo fotosintético propuesto por Farquhar et al. (1980) las medidas de intercambio gaseoso y, concretamente, las respuestas de la fotosíntesis neta a la concentración interna de CO<sub>2</sub> han sido ampliamente utilizadas para modelizar la respuesta fotosintética en las plantas. El análisis de las curvas  $A/C_i$  permite la determinación de las tasas de carboxilación, regeneración de la ribulosa bisfosfato o la salida de las triosas fosfato del cloroplasto, así como la cuantificación de la capacidad máxima de carboxilación ( $V_{cmax}$ ), la máxima capacidad de la tasa de transporte de electrones ( $J_{max}$ ) y la velocidad de la utilización de las triosas fosfato (TPU). Estos análisis han sido probados de forma útil para desarrollar modelos predictivos de asimilación de CO<sub>2</sub> en cultivos (Díaz-Espejo et al., 2006) y en vegetación natural (Xu y Baldocchi, 2003), para ayudar a predecir los efectos del cambio climático en la fotosíntesis (Sabaté et al., 2002), como una base fisiológica sólida para extrapolar los modelos de asimilación de carbono de la hoja a planta entera y/o ecosistemas (Woodward et al., 1995) y para evaluar la influencia de los estreses, tales como la sequía (Wilson et al., 2000), la salinidad (Centritto et al., 2003), temperaturas extremas

(Zhou et al., 2004), restricciones de luz (Schultz, 2003), deficiencia de nutrientes (Warren, 2004) o estreses bióticos (Sampol et al., 2003) sobre la capacidad fotosintética.

La limitación bioquímica a la tasa de fotosíntesis puede dividirse en tres apartados generales, 1) el suministro o utilización de CO<sub>2</sub>, 2) el suministro o utilización de luz y 3) el suministro o utilización de fósforo inorgánico. La primera limitación se puede determinar analizando cómo la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> varía con la presión parcial de CO<sub>2</sub> dentro de la hoja. La segunda limitación puede ser estudiada mediante la determinación del requerimiento cuántico de la fotosíntesis. La tercera limitación es la más sencilla de analizar mediante la pérdida de sensibilidad fotosintética al CO<sub>2</sub> (Sharkey, 1985).

Como se ha señalado anteriormente, el elevado CO<sub>2</sub> aumenta las tasas de asimilación fotosintética y la productividad (Wang et al., 2000), especialmente en las plantas con metabolismo C3 (Drake et al., 1997). Este aumento de la tasa de fijación de CO<sub>2</sub> es particularmente notable cuando otros factores como el agua, nutrientes, temperatura o luz no son limitantes (Lawlor y Michell, 1991). La fotosíntesis en plantas C3 responde a la elevada concentración de CO<sub>2</sub> atmosférica porque la concentración actual no satura la Rubisco. Además, la fotorrespiración es inhibida por mayores niveles de CO<sub>2</sub> (Long y Drake, 1992; Drake et al., 1997). Sin embargo, como se ha dicho anteriormente, estas respuestas se ven modificadas por otros factores ambientales de forma que son necesarios más estudios para explicar la relación entre la estimulación de la fotosíntesis y los parámetros bioquímicos y fisiológicos que controlan la asimilación neta de carbono, y la forma en que los estreses en general y, el estrés hídrico en particular, pueden modular la dinámica de los procesos que constituyen la fotosíntesis como un todo. Es bien conocido que el déficit hídrico disminuye la capacidad fotosintética mientras que el efecto puede ser retrasado o amortiguado por el elevado CO<sub>2</sub> atmosférico, pero no hay acuerdo en la naturaleza de los mecanismos fisiológicos (Habash et al., 1995; Lawlor, 2002; Tezara et al., 2002). Por eso, se ha sugerido que la mayor parte de la reducción en la tasa de fotosíntesis, en respuesta al estrés hídrico, es atribuida al cierre estomático; sin embargo, el descenso del potencial hídrico también afecta a la capacidad intrínseca fotosintética.

Algunos factores bióticos y abióticos pueden inducir perturbaciones en el metabolismo fotosintético de manera que se produzcan modificaciones significativas en las características cinéticas de emisión de la fluorescencia en las plantas. La relación entre el  $\Phi$ PSII y la asimilación de CO<sub>2</sub> en las hojas permite utilizar la fluorescencia para

detectar diferencias en la respuesta de las plantas a los cambios ambientales y, consecuentemente, analizar la tolerancia a los ambientes de estrés. Los cambios en el PSII son determinados por la habilidad de transferir los electrones desde éste, y no mediante el quenching no fotoquímico en los sistemas antena del PSII (Baker y Rosenqvist, 2004). Como consecuencia del descenso en la eficiencia de carboxilación, de la tasa de regeneración de la ribulosa-1,5-bisfosfato, del suministro estomático de CO<sub>2</sub> hacia los lugares de carboxilación o del transporte de carbohidratos fuera de las células, se producen descensos en la tasa de consumo de NADPH y ATP. Esto ocasiona restricciones en el transporte electrónico del PSII lo que puede resultar en un aumento de la diferencia de potencial electroquímico de protones a través de la membrana tilacoidal, conllevando un aumento del quenching no fotoquímico en los sistemas antena del PSII. Con niveles elevados de estrés, los aumentos en el  $qNP$  pueden ser insuficientes para mantener los aceptores de electrones del PSII parcialmente oxidados y podrá ocurrir el consiguiente daño por luz del PSII a menos que se utilicen aceptores de electrones alternativos, tales como el oxígeno (Ort y Baker, 2002). Por lo tanto, la habilidad para mantener los aceptores del PSII parcialmente oxidados es un factor clave en la tolerancia a los estreses ambientales (Rosenqvist, 2001). Dicho mantenimiento puede lograrse mediante el consumo del NADPH fotogenerado cuando se incrementa la concentración de CO<sub>2</sub> del ambiente.

En muchas regiones del planeta el cambio climático antropogénico está provocando amplios periodos de altas temperaturas y reducción del suministro de agua a los cultivos (Houghton et al., 2001; McCarthy et al., 2001). La menor disponibilidad de agua provoca en los cultivos un descenso en el contenido hídrico en hojas lo que induce, primeramente, cierre estomático, imponiendo una restricción a la entrada de CO<sub>2</sub> a las células del mesófilo y, por consiguiente, produciendo un descenso en la tasa de asimilación fotosintética en la hoja (Williams et al., 1999; Lawlor y Cornic, 2002). Estos efectos estomáticos sobre la fotosíntesis no parecen perturbar los procesos de eficiencia fotoquímica del PSII o modificar otros parámetros asociados a la fluorescencia como la relación  $F_v/F_m$ . Las limitaciones estomáticas impuestas sobre la fotosíntesis podrían estar acompañadas por el descenso de consumo de ATP y NADPH para la asimilación de CO<sub>2</sub>, lo cual podría derivar en un descenso de la tasa lineal de transporte de electrones y, por lo tanto, en algunos parámetros de la fluorescencia (Baker y Rosenqvist, 2004).

En el presente trabajo tratamos de comparar los efectos del elevado CO<sub>2</sub> sobre los aspectos fotosintéticos de la cebada y estudiar la interacción de estos efectos con los efectos de la sequía basándonos en la importancia del intercambio gaseoso con la fotosíntesis como mecanismo primario para la obtención de energía. También analizamos algunos aspectos básicos de la fluorescencia como mecanismo de disipación de exceso de energía y utilización de la energía lumínica capturada.

Los objetivos principales de este capítulo son:

- Conocer los efectos de la sequía en el metabolismo fotosintético bajo ambas [CO<sub>2</sub>], ambiental y elevada.
- Ver si existe aclimatación de la asimilación en condiciones de elevado CO<sub>2</sub>.
- Determinar si la mejor conservación del agua en las plantas que crecen a elevado CO<sub>2</sub> se debe a un ajuste estomático.
- Analizar el efecto combinado de la sequía y el elevado CO<sub>2</sub> sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos, el funcionamiento del aparato fotosintético mediante el análisis de la fluorescencia de la clorofila *a* y evaluar si el elevado CO<sub>2</sub> mejora la utilización de la energía lumínica capturada, de modo que el riesgo de fotoinhibición disminuya en condiciones de estrés hídrico.
- Estudiar la capacidad fotosintética de recuperación de plantas rehidratadas tras el periodo de sequía.

Para llevar a cabo estos objetivos se realizaron las siguientes determinaciones: se analizaron los parámetros fotosintéticos de *g<sub>s</sub>*, *A*, *C<sub>i</sub>* y *E*. Así mismo, se estudió la posible aclimatación de la fotosíntesis. Se analizaron las curvas de respuesta a diferentes [CO<sub>2</sub>] y de respuesta a diferentes intensidades de luz. Por último, se determinaron los parámetros de fluorescencia y el contenido en pigmentos fotosintéticos.

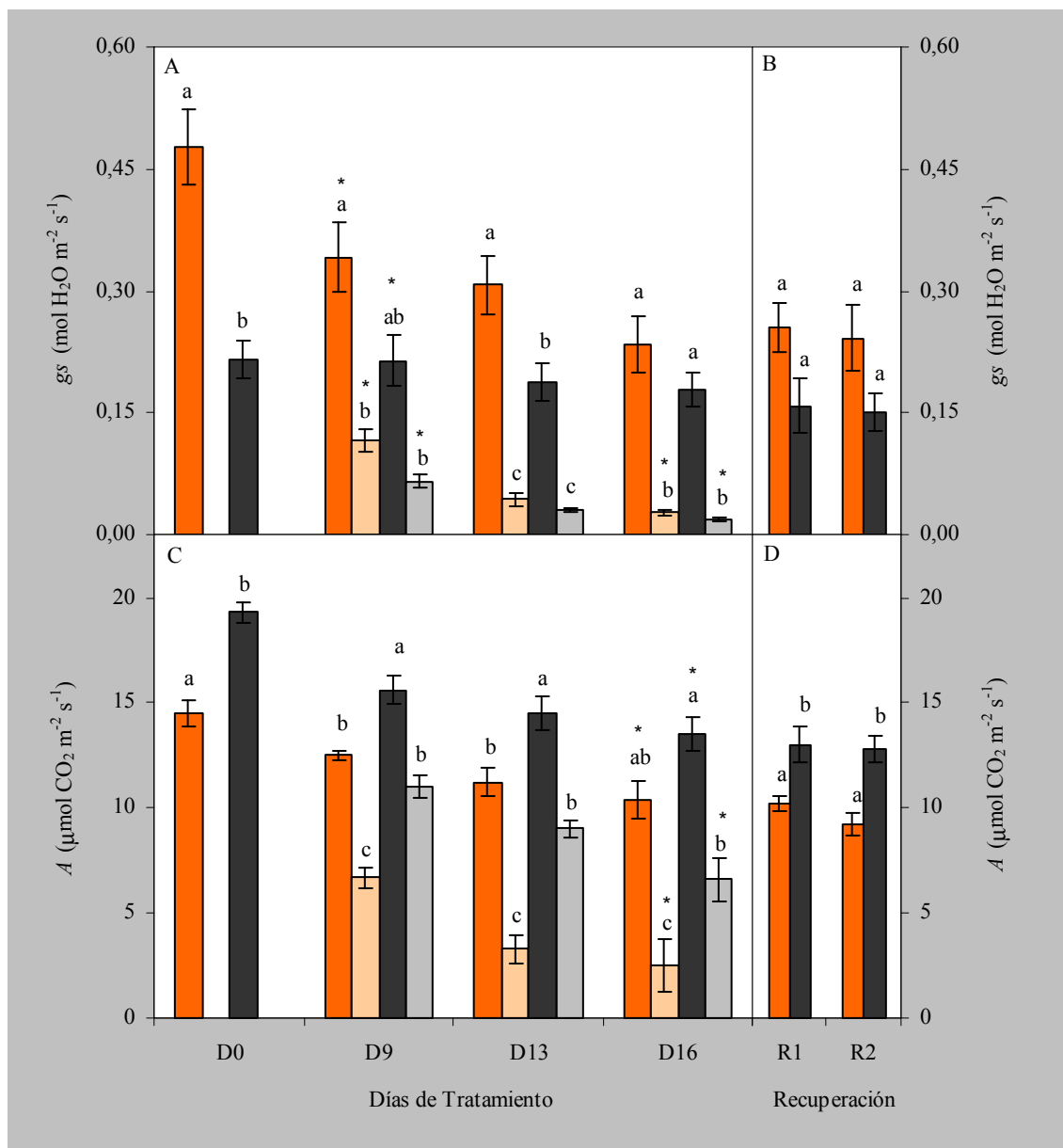
## 4.2. Resultados

### 4.2.1. Fotosíntesis

#### 4.2.1.1. Conductancia estomática, $g_s$ , asimilación, $A$ , concentración interna de $\text{CO}_2$ , $C_i$ , y transpiración instantánea, $E$ . Eficiencia instantánea en el uso del agua, $ITE$

La conductancia estomática ( $g_s$ ) disminuyó con el tiempo de exposición de la planta al tratamiento ( $P \leq 0,001$ ) y fue influenciada por la  $[\text{CO}_2]$  ( $P \leq 0,001$ ) y la sequía ( $P \leq 0,001$ ). La  $g_s$  en plantas regadas fue menor (40% de media) por efecto de la elevada  $[\text{CO}_2]$ . También se observaron diferencias significativas en  $g_s$  entre los tratamientos de  $\text{CO}_2$  cuando eran plantas sometidas a sequía. Esto quiere decir que se observó una  $g_s$  30% y 43% inferior a elevada  $[\text{CO}_2]$  que a  $[\text{CO}_2]$  ambiental tras 16 días de sequía (Fig. 4.1A). Sin embargo, en general, el elevado  $\text{CO}_2$  causó una mayor reducción en  $g_s$  en plantas regadas que en plantas bajo estrés hídrico. Por otro lado, aunque la  $g_s$  fue más baja a elevada  $[\text{CO}_2]$  que a  $[\text{CO}_2]$  ambiental, disminuyó un porcentaje similar (~90%) durante el periodo de estrés hídrico. Tras el restablecimiento del riego se vio como las plantas de  $[\text{CO}_2]$  ambiental alcanzaron valores de  $g_s$  similares al control tras 3-7 días de recuperación (Fig. 4.1B). Las plantas de elevada  $[\text{CO}_2]$  mostraban esta misma tendencia presentando valores de un 89% y un 84% del control, para R1 y R2, respectivamente (Fig. 4.1B).

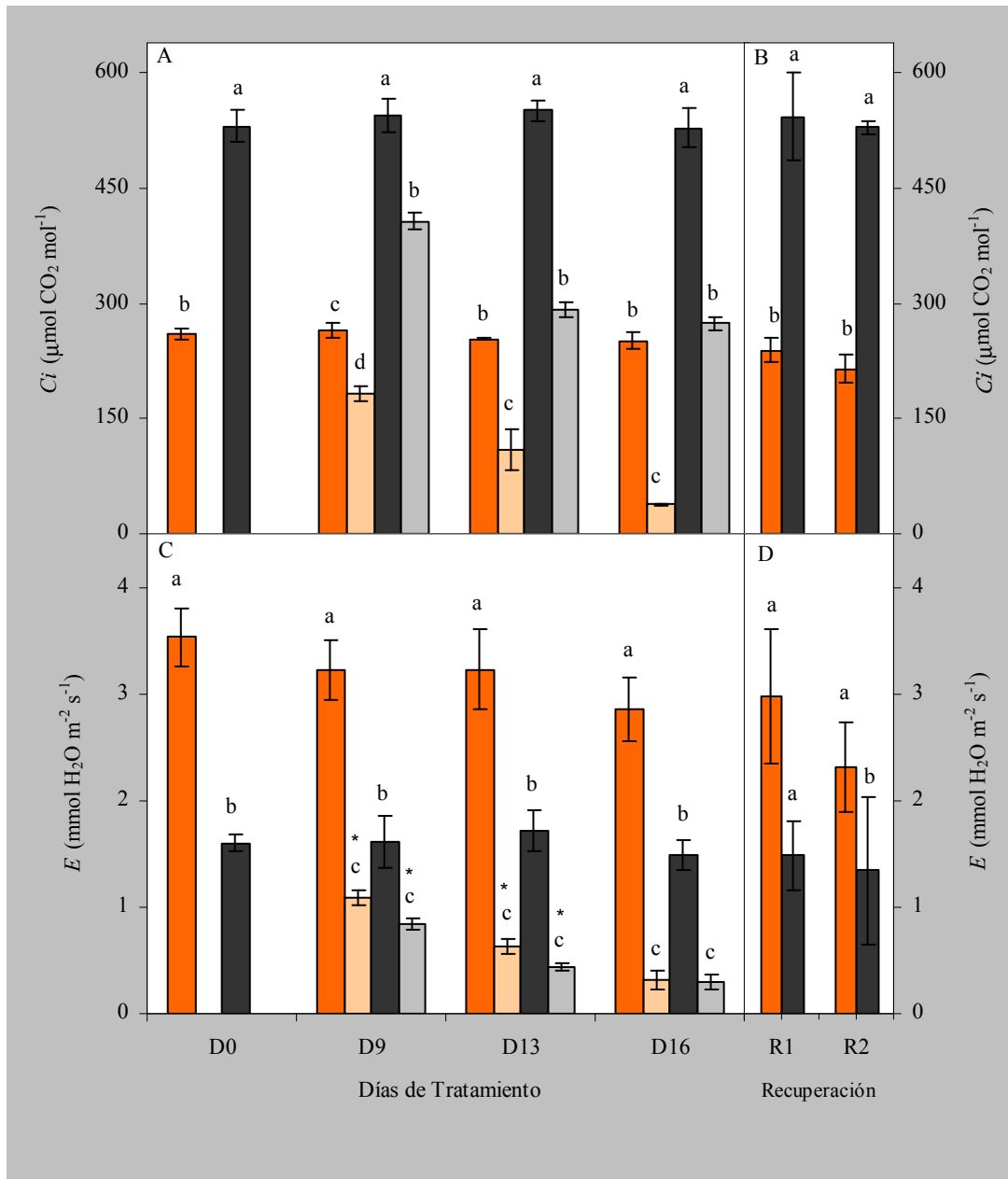
La asimilación fotosintética ( $A$ , Fig. 4.1C) también se vio influenciada significativamente por el régimen hídrico ( $P \leq 0,001$ ), por la  $[\text{CO}_2]$  ( $P \leq 0,001$ ) y por el tiempo de exposición al tratamiento ( $P \leq 0,001$ ). En plantas regadas, por efecto del tiempo de exposición al tratamiento, la  $A$  disminuyó en torno a un 30% bajo ambas  $[\text{CO}_2]$ . La  $[\text{CO}_2]$  aumentó la  $A$  tanto en plantas regadas como en sequía (Fig. 4.1C). Según fue avanzando el periodo de estudio, la sequía más severa disminuía la  $A$  con valores que llegaron a ser tan solo un 34% y un 49% del de plantas regadas crecidas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental y elevada  $[\text{CO}_2]$ , respectivamente. A lo largo de todo el experimento las plantas bien regadas crecidas a elevada  $[\text{CO}_2]$  presentaron alrededor de un 30% más de  $A$  que las plantas de  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Tras 9, 13 y 16 días de sequía las plantas presentaron un 64%, 200% y 164% más de  $A$  a elevada  $[\text{CO}_2]$  que a  $[\text{CO}_2]$  ambiental.



| Parámetro | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|-----------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| gs        | ***             | ***                 | ***    | **                                    | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |
| A         | ***             | ***                 | ***    | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento

**Fig. 4.1.** A) Interacción a lo largo del tiempo entre la disponibilidad de agua y el CO<sub>2</sub> atmosférico en la *gs* y C) interacción entre la disponibilidad de agua y el CO<sub>2</sub> atmosférico en la *A*. Recuperación de las plantas durante 7 días (R1) y 3 días (R2) sometidas a sequía durante 9 y 13 días, respectivamente, de la *gs* (B) y de la *A* (D). D0 representa plantas bien regadas al inicio del estudio: [CO<sub>2</sub>] ambiental (barras color naranja) y [CO<sub>2</sub>] elevado (barras color gris); D9, D13 y D16 representan los días 9, 13 y 16, respectivamente, donde se mantienen plantas regadas (barras oscuras) y en sequía (barras claras). Los valores son la media + ES de tres experimentos, repetido cada uno de ellos tres veces. Dentro del mismo día de medida, las diferencias significativas vienen representadas por diferentes letras a un nivel de significancia de  $P \leq 0,05$ . El \* indica diferencias significativas a  $P \leq 0,05$  entre los tratamientos de CO<sub>2</sub>.



| Parámetro | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|-----------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| <i>Ci</i> | ***             | ***                 | ***    | n.s.                                  | *                        | ***                          | n.s.   |
| <i>E</i>  | ***             | *                   | ***    | n.s.                                  | ***                      | n.s.                         | n.s.   |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento

**Fig 4.2.** A) Interacción a lo largo del tiempo de la sequía y el elevado CO<sub>2</sub> sobre la concentración interna de CO<sub>2</sub>, *Ci* y C) interacción a lo largo del tiempo de la sequía y el elevado CO<sub>2</sub> sobre la transpiración instantánea, *E*. Recuperación de las plantas durante 7 días, R1 y durante 3 días, R2, sometidas a previa sequía durante 9 y 13 días, respectivamente, de la *Ci* (B) y de la *E* (D). Condiciones de crecimiento y análisis estadístico como en Fig. 4.1.



Por tanto, el efecto de la sequía sobre  $A$  fue un 15% mayor a  $[\text{CO}_2]$  ambiental que a elevada  $[\text{CO}_2]$  para un mismo potencial hídrico, -1,30 MPa (plantas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental, tras 13 días de sequía y a elevada  $[\text{CO}_2]$ , tras 16 días de sequía) (Fig. 4.3).

Después de la recuperación hídrica, a  $[\text{CO}_2]$  ambiental, el valor de  $A$  de las plantas del tratamiento R1 fue igual al control y el del tratamiento R2 alcanzó un 88% del valor control (Fig. 4.1D). A elevada  $[\text{CO}_2]$ , las plantas en recuperación, tanto R1 como R2, alcanzaron valores superiores al 95% del control (Fig. 4.1D).

La concentración interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) fue mayor ( $P \leq 0,001$ ) a elevado  $\text{CO}_2$  que a  $\text{CO}_2$  ambiental (Fig. 4.2A). Sin embargo, a pesar de la significativa reducción de la  $g_s$  a elevado  $\text{CO}_2$ , la relación media  $C_i/C_a$  (Tabla 4.1) no se vio afectada: 0,74 a 350  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  vs. 0,77 a 700  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ . Sin embargo, esta proporción varió cuando se analizó en plantas sometidas a 13 días de sequía y  $[\text{CO}_2]$  ambiental: 0,314 y 0,393 en plantas en sequía durante 16 días y elevada  $[\text{CO}_2]$ , siendo la disponibilidad del agua en el suelo un 75% en ambas  $[\text{CO}_2]$ .

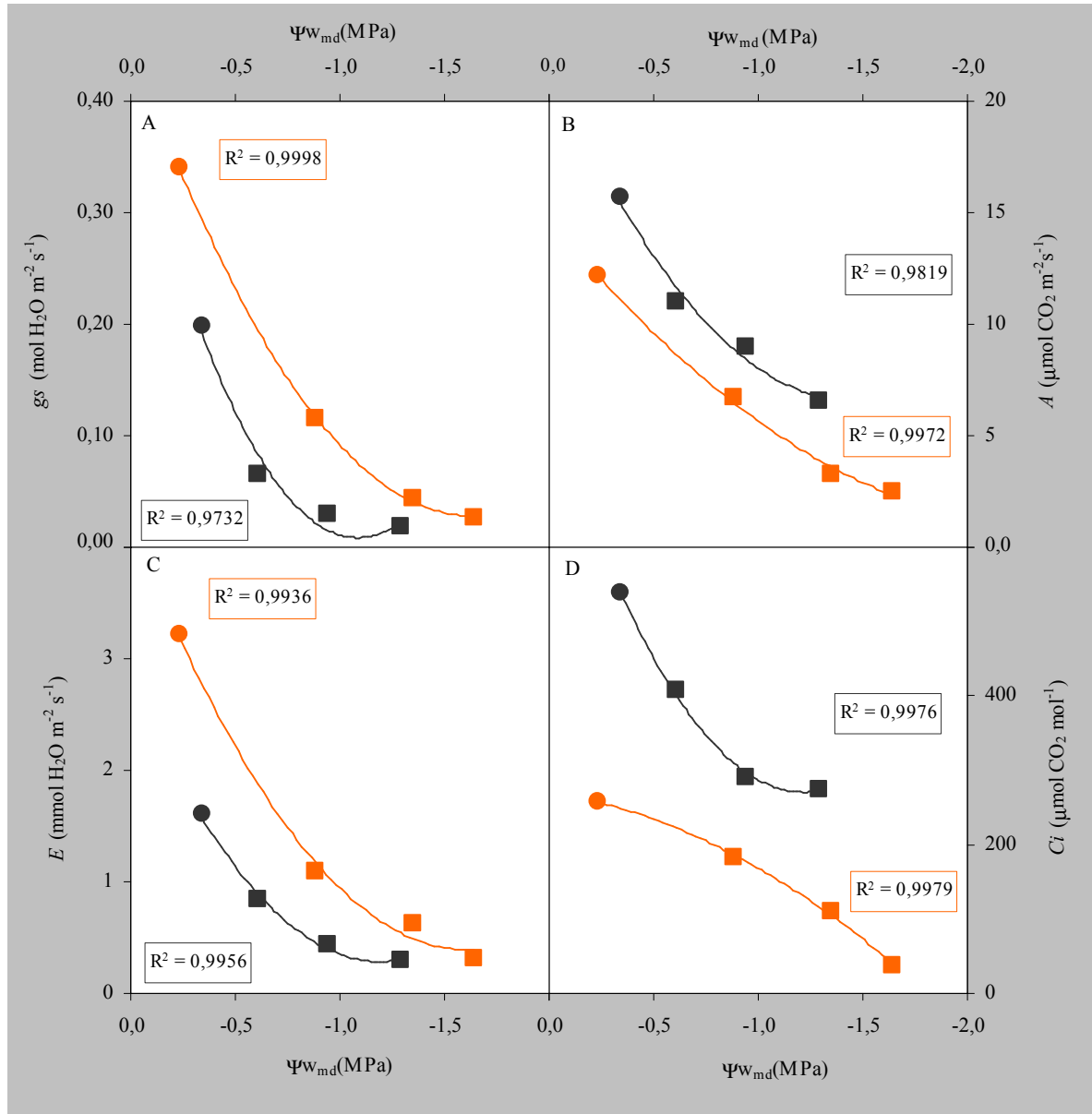
**Tabla 4.1.** Relación  $C_i/C_a$  a lo largo de los 16 días de experimento. 350ppm =  $[\text{CO}_2]$  ambiental (color naranja) y 700ppm =  $[\text{CO}_2]$  elevado (color gris). Plantas regadas-control (color oscuro) y en sequía (color claro).

| Días | Control |        | Sequía |        |
|------|---------|--------|--------|--------|
|      | 350ppm  | 700ppm | 350ppm | 700ppm |
| 0    | 0,746   | 0,759  | 0,746  | 0,759  |
| 9    | 0,757   | 0,780  | 0,523  | 0,581  |
| 13   | 0,726   | 0,789  | 0,314  | 0,416  |
| 16   | 0,720   | 0,756  | 0,109  | 0,393  |

En respuesta a la disponibilidad hídrica,  $C_i$  disminuyó en paralelo con el  $\Psi_w$  ( $P \leq 0,001$ ) (Fig. 4.3D). Después de 16 días de sequía, se obtuvo un descenso del 85% en plantas a  $\text{CO}_2$  ambiental, mientras que el descenso en plantas a elevado  $\text{CO}_2$  fue solo de un 44%. Tras el restablecimiento del riego, los valores de  $C_i$  de plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$  se recuperaron al 100% (Fig. 4.2B). A  $[\text{CO}_2]$  ambiental las plantas en recuperación, R1 y R2, mostraron valores de un 89% y 84% del control, respectivamente (Fig. 4.2B).

Tanto la concentración de  $\text{CO}_2$  como el régimen hídrico modificaron la transpiración instantánea,  $E$  ( $P \leq 0,001$ ; Fig. 4.2C). En plantas control, el elevado  $\text{CO}_2$  disminuyó la  $E$ , aproximadamente un 50%, asociado a una menor  $g_s$  ( $P \leq 0,001$ ; Fig. 4.1A). La sequía redujo el intercambio de vapor de agua entre un 70% después de 9 días

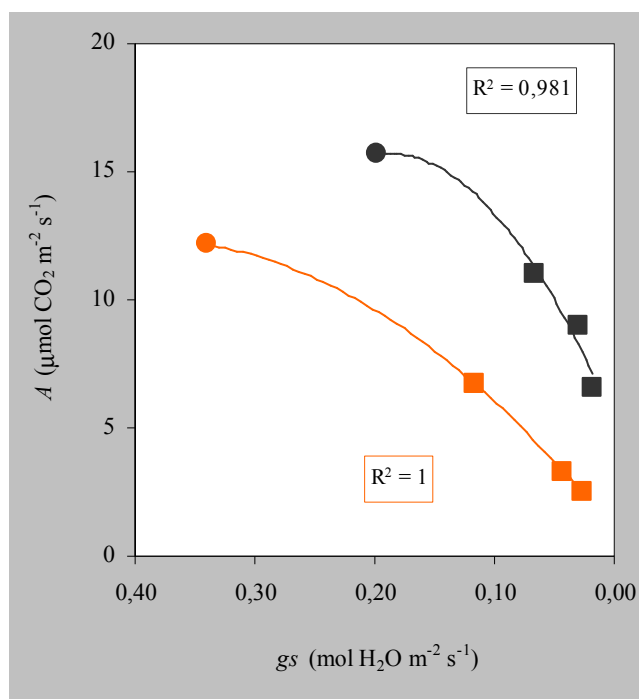
en sequía y un 90% en plantas de 16 días en sequía. En plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$  se observó que la tasa de  $E$  a lo largo de todo el periodo de sequía disminuyó un 10% menos que a  $[\text{CO}_2]$  ambiental (Fig. 4.2C).



**Fig. 4.3.** **A)** Relación entre la conductancia estomática ( $g_s$ ) y el potencial hídrico ( $\Psi_{w_{md}}$ ). **B)** Relación entre la asimilación ( $A$ ) y el potencial hídrico ( $\Psi_{w_{md}}$ ). **C)** Relación entre la transpiración instantánea ( $E$ ) y el potencial hídrico ( $\Psi_{w_{md}}$ ). **D)** Relación entre la concentración interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) y el potencial hídrico ( $\Psi_{w_{md}}$ ). Los círculos se corresponden con plantas regadas (valor medio de los controles de todo el experimento) y los cuadrados representan plantas en sequía durante 9, 13 y 16 días. Elevada  $[\text{CO}_2]$  en color gris y  $[\text{CO}_2]$  ambiental en color naranja. Las líneas de tendencia y los factores de correlación se corresponden a funciones polinómicas de grado 2.

Consecuentemente, en las plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$  se observó una transpiración instantánea más conservadora en ambos regímenes hídricos (Fig. 4.2C). Cuando se inició la recuperación el efecto del estrés hídrico sobre la  $E$  fue revertido (Fig. 4.2D) puesto que tanto a  $[\text{CO}_2]$  elevada como  $[\text{CO}_2]$  ambiental las plantas del tratamiento R1 mostraron valores similares al control y las plantas del tratamiento R2 presentaron valores del 80% y 90% respecto al control a  $[\text{CO}_2]$  ambiental y elevada  $[\text{CO}_2]$ , respectivamente (Fig. 4.2D).

Relacionando los parámetros fotosintéticos con el potencial hídrico (Fig. 4.3) se pudo observar una estrecha correlación entre la caída de  $A$  (Fig. 4.3B), de la  $g_s$  (Fig. 4.3A), de la  $E$  (Fig. 4.3C) y de la  $C_i$  (Fig. 4.3D) con el  $\Psi_{w_{md}}$ . Las tasas de fotosíntesis y  $C_i$  siempre fueron superiores en condiciones de elevado  $\text{CO}_2$ , tanto riego como sequía, a potenciales hídricos similares. Por el contrario los valores de la  $g_s$  y la  $E$  siempre fueron inferiores a elevada  $[\text{CO}_2]$  que a  $[\text{CO}_2]$  ambiental.



**Fig. 4.4.** Relación entre la asimilación fotosintética ( $A$ ) y la conductancia estomática ( $g_s$ ). Los círculos se corresponden con plantas regadas (valor medio de los controles de todo el experimento) y los cuadrados representan plantas en sequía durante 9, 13 y 16 días. Elevada  $[\text{CO}_2]$  en color gris y  $[\text{CO}_2]$  ambiental en color naranja. Las líneas de tendencia y los factores de correlación se corresponden a funciones polinómicas de grado 2.

Como puede observarse en la Fig. 4.4, la pérdida de capacidad asimilatoria pudo deberse fundamentalmente a un efecto estomático. A pesar de que las plantas creciendo a elevada  $[\text{CO}_2]$  presentaron una  $g_s$  bastante inferior (Fig. 4.1A) a la de plantas bajo  $[\text{CO}_2]$  ambiental, la  $A$  (Fig. 4.1B) fue mucho mayor a elevada  $[\text{CO}_2]$ , aún en los momentos en los que el  $\Psi_{w_{md}}$  era más negativo y los estomas estaban más cerrados (Fig. 4.4).

La eficiencia instantánea en el uso del agua ( $ITE$ ) resultó marcadamente afectada tanto por la  $[\text{CO}_2]$  de crecimiento ( $P \leq 0,001$ ) como por el régimen hídrico ( $P \leq 0,001$ ) (Tabla 4.2). Cabe señalar también que el tiempo de exposición al tratamiento, el  $\text{CO}_2$  y la sequía así como todas sus interacciones fueron estadísticamente significativas ( $P \leq 0,001$ , Tabla 4.2).

A lo largo de todo el periodo experimental, la falta de agua provocó un incremento significativo de  $ITE$  del 87% bajo ambas  $[\text{CO}_2]$ . Comparando las sequías con sus correspondientes controles cada día de medida, se obtuvieron valores de  $ITE$  siempre superiores que en plantas regadas. Esto es, por un lado, bajo  $[\text{CO}_2]$  ambiental se observaron valores de  $ITE$  de un 59%, 60% y un 117% mayores para las sequías de D9, D13 y D16, respectivamente, respecto a sus plantas regadas y por otro lado, bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  los valores de  $ITE$  fueron un 35%, 144% y 149% mayores para las sequías D9, D13 y D16, respectivamente, respecto a sus plantas regadas.

La  $ITE$  fue significativamente mayor en plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$  que en plantas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental. En el caso de plantas regadas los porcentajes fueron del 195%, 149%, 140% y 153% superiores, en los días D0, D9, D13 y D16, respectivamente. Comparando entre las plantas en sequía, los porcentajes también fueron superiores bajo elevada  $[\text{CO}_2]$ , un 111%, 266% y 195%, en los días D9, D13 y D16, respectivamente.

Cuando se inició la recuperación el efecto del estrés hídrico sobre la  $ITE$  fue revertido (Tabla 4.2) puesto que tanto a  $[\text{CO}_2]$  elevada como  $[\text{CO}_2]$  ambiental las plantas de los tratamientos R1 y R2 mostraron valores similares al control (Tabla 4.2).

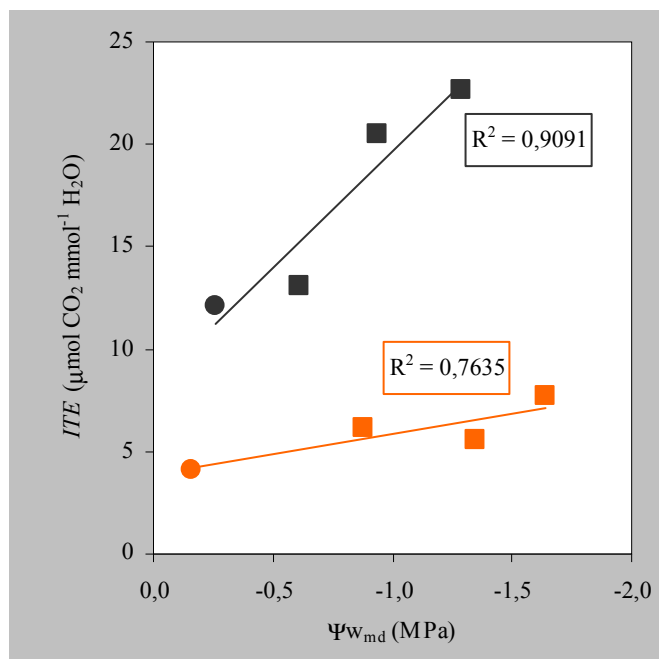
**Tabla 4.2.** Interacción entre la  $[\text{CO}_2]$  atmosférica y la disponibilidad hídrica en la *ITE*. Los valores son la media  $\pm$  ES de al menos tres experimentos independientes cada uno de ellos repetido tres veces. 350ppm =  $[\text{CO}_2]$  ambiental (color naranja) y 700ppm =  $[\text{CO}_2]$  elevado (color gris). Plantas regadas (color oscuro) y en sequía (color claro). Dentro del mismo día de medida, las letras indican diferencias significativas a  $P \leq 0,05$ .

| <i>ITE</i> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ) |      |                    |                    |
|---|------|--------------------|--------------------|
| Días  | iego | 350ppm             | 700ppm             |
| 0   | C    | 4,10 $\pm$ 0,18 a  | 12,06 $\pm$ 0,71 b |
| 9   | C    | 3,87 $\pm$ 0,34 a  | 9,69 $\pm$ 1,38 bd |
|   | S    | 6,20 $\pm$ 0,57 b  | 13,10 $\pm$ 1,38 d |
| 13  | C    | 3,47 $\pm$ 0,33 a  | 8,43 $\pm$ 1,04 b  |
|   | S    | 5,60 $\pm$ 0,72 ab | 20,45 $\pm$ 2,58 c |
| 16  | C    | 3,64 $\pm$ 0,91 a  | 9,06 $\pm$ 1,09 b  |
|   | S    | 7,81 $\pm$ 1,53 b  | 22,76 $\pm$ 4,91 c |
|   | R1   | 3,42 $\pm$ 0,51 a  | 8,78 $\pm$ 2,74 b  |
|   | R2   | 3,98 $\pm$ 0,62 a  | 9,55 $\pm$ 1,05 b  |

| Parámetro  | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|------------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| <i>ITE</i> | ***             | ***                 | ***    | **                                    | ***                      | **                           | **   |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento

A similares  $\Psi_{w_{md}}$ , la *ITE* fue significativamente mayor ( $P \leq 0,001$ ) en plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$  que en plantas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental (Fig. 4.5). Así, cuando el  $\Psi_{w_{md}}$  era  $-0,20$  MPa, la *ITE* fue 2,64 veces mayor a  $700 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ , 3,3 veces mayor cuando el  $\Psi_{w_{md}}$  era  $-0,90$  MPa, y aproximadamente 4 veces mayor cuando el  $\Psi_{w_{md}}$  cayó hasta  $-1,30$  MPa.



**Fig. 4.5.** Relación entre la eficiencia instantánea en el uso del agua (*ITE*) y el potencial hídrico ( $\Psi_{w_{md}}$ ). Los círculos se corresponden con plantas regadas en el día 0 del experimento y los cuadrados representan plantas en sequía durante 9, 13 y 16 días. Elevada  $[CO_2]$  en color gris y  $[CO_2]$  ambiental en color naranja. Las líneas de tendencia y el factor de correlación se corresponden a funciones lineales.

#### 4.2.1.2. Rendimiento fotosintético, $\phi$ y requerimiento cuántico, *RQ*

El rendimiento fotosintético ( $\phi$ ) fue significativamente modificado por la sequía ( $P \leq 0,001$ ), por la  $[CO_2]$  ( $P \leq 0,001$ ) y por el tiempo de exposición al tratamiento ( $P \leq 0,001$ ; Tabla 4.3). Como se puede observar, la sequía provocó un notable descenso en el  $\phi$  ya que, tras 9, 13 y 16 días de sequía disminuyó un 54%, 77% y un 83%, respectivamente a  $[CO_2]$  ambiental y un 43%, 53% y 66% a elevada  $[CO_2]$  respecto al día 0 (Tabla 4.3). La  $[CO_2]$  modificó positivamente el  $\phi$  tanto en el tratamiento de riego como en el de sequía (Tabla 4.3). Al inicio del experimento, cuando la sequía todavía no había comenzado, el rendimiento en las plantas control fue un 33% superior a elevada  $[CO_2]$  que a  $[CO_2]$  ambiental. Tras 9, 13 y 16 días de sequía, el rendimiento también fue un 64%, 173% y un 164% superior, respectivamente, a elevada  $[CO_2]$  comparando con las de  $[CO_2]$  ambiental.

El *RQ* se vio afectado tanto por la  $[CO_2]$  como por la disponibilidad hídrica del tratamiento ( $P \leq 0,001$ ), por el tiempo de exposición al tratamiento ( $P \leq 0,001$ ) y por todas las interacciones posibles entre las variables ( $P \leq 0,001$ , Tabla 4.3). Observamos

que las plantas creciendo a  $[\text{CO}_2]$  ambiental presentaban un  $RQ$  superior a las plantas de elevada  $[\text{CO}_2]$ . Las plantas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental regadas presentaron un 33% más de  $RQ$  que las plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$  al comienzo del estudio. Por otro lado, a medida que aumentaba la sequía, el  $RQ$  aumentó hasta un 66% y un 83% en plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$  y en plantas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental, respectivamente, tras los 16 días de tratamiento.

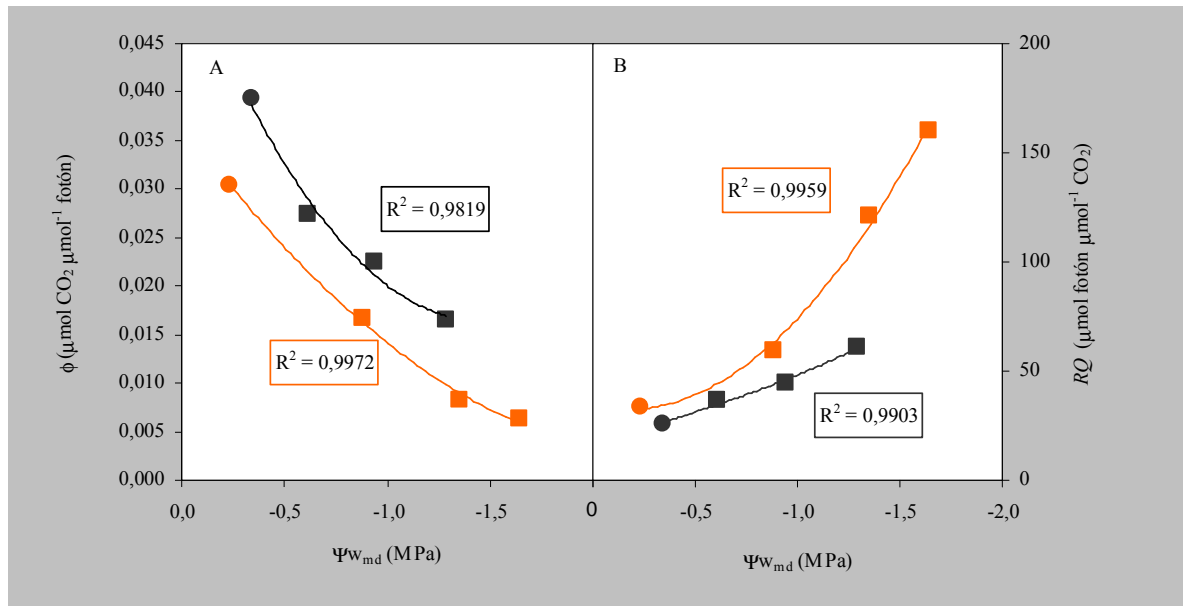
**Tabla 4.3.** Efecto de la sequía progresiva en el rendimiento fotosintético ( $\phi$ ) y requerimiento cuántico ( $RQ$ ) a lo largo de los 16 días de experimento. 350ppm =  $[\text{CO}_2]$  ambiental (color naranja) y 700ppm =  $[\text{CO}_2]$  elevado (color gris). Plantas regadas (color oscuro) y en sequía (color claro).

| Días | $\phi$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol}^{-1}$ fotones) |                       | $RQ$ ( $\mu\text{mol fotones } \mu\text{mol}^{-1} \text{CO}_2$ ) |               |
|------|---|-----------------------|--|---------------|
|      | 350ppm  | 700ppm                | 350ppm   | 700ppm        |
| 0    | 0,03625 $\pm$ 0,0016a                                     | 0,04825 $\pm$ 0,0014b | 28 $\pm$ 1,3a  | 21 $\pm$ 0,7b |
| 9    | 0,01675 $\pm$ 0,0012a                                     | 0,02750 $\pm$ 0,0016b | 60 $\pm$ 5,0a  | 36 $\pm$ 2,0b |
| 13   | 0,00825 $\pm$ 0,0017a                                     | 0,02250 $\pm$ 0,0016b | 121 $\pm$ 25,2a  | 44 $\pm$ 4,0b |
| 16   | 0,00625 $\pm$ 0,0001a                                     | 0,01650 $\pm$ 0,0026b | 160 $\pm$ 23,4a  | 61 $\pm$ 9,2b |

| Parámetro | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|-----------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| $\phi$    | ***             | ***                 | ***    | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |
| $RQ$      | ***             | ***                 | ***    | **                                    | ***                      | ***                          | **   |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento

Como vemos en la Fig. 4.6 aún para un potencial hídrico similar (-1,30 MPa), el  $RQ$  de las plantas de elevada  $[\text{CO}_2]$  seguía siendo un 60% inferior al de las plantas creciendo a  $[\text{CO}_2]$  ambiental (Fig. 4.6B).



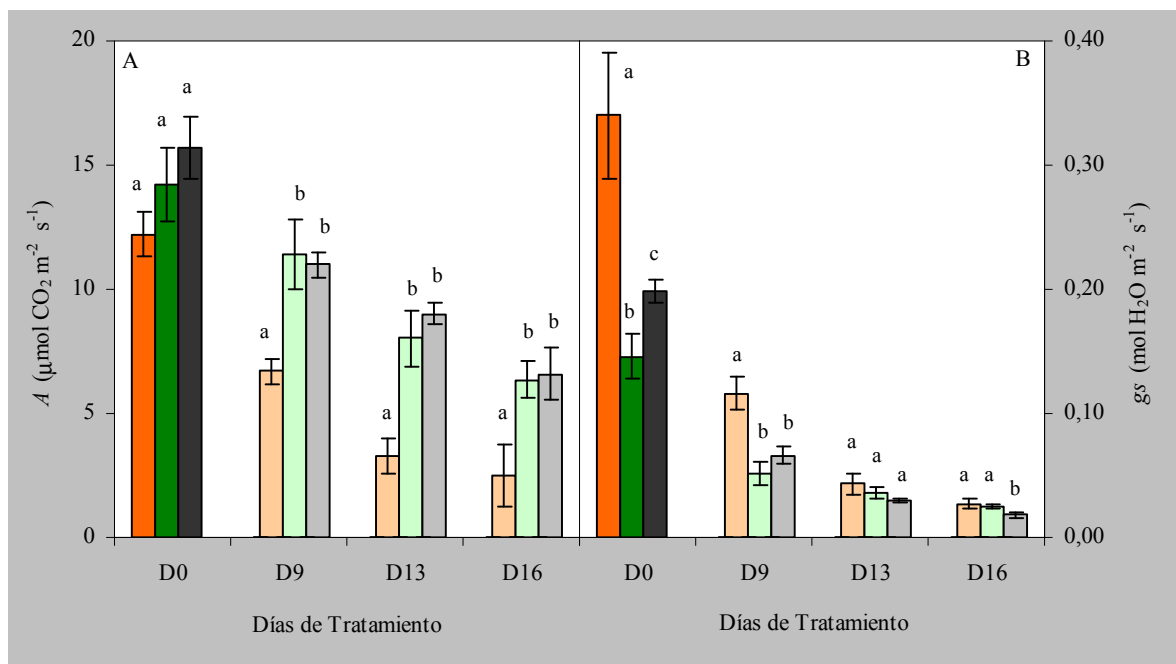
**Fig. 4.6.** **A)** Relación entre el rendimiento cuántico ( $\phi$ ) y el potencial hídrico ( $\Psi_{w_{md}}$ ). **B)** Relación entre el requerimiento cuántico ( $RQ$ ) y el potencial hídrico ( $\Psi_{w_{md}}$ ). Los círculos se corresponden con plantas regadas en el día 0 del experimento y los cuadrados representan plantas en sequía durante 9, 13 y 16 días. Elevada  $[\text{CO}_2]$  en color gris y  $[\text{CO}_2]$  ambiental en color naranja. Las líneas de tendencia y el factor de correlación se corresponden a funciones polinómicas de grado 2.

#### 4.2.1.3. Aclimatación

La aclimatación (Fig. 4.7) o regulación a la baja de la  $A$  y la  $g_s$  en respuesta al elevado  $\text{CO}_2$  fue determinada comparando la tasas de asimilación medidas a  $700 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$  tanto de las plantas crecidas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental como a elevada  $[\text{CO}_2]$ . En plantas regadas, la media de las tasas fotosintéticas (Fig. 4.7A) crecidas y medidas a  $700 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$  fue mayor (11%) que la de plantas crecidas a  $350 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$  y medidas a  $700 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ , si bien esa mayor tasa no fue estadísticamente significativa ( $P = 0,061$ ).

En el caso de las plantas en sequía, la  $A$  de las plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$  no fue significativamente diferente a la de plantas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental medidas a  $C_a = 700 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ .





**Fig. 4.7.** **A)** Tasa de asimilación fotosintética ( $A$ ) y **B)** conductancia estomática ( $g_s$ ), de plantas crecidas y medidas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental (barras naranjas), de plantas crecidas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental y medidas a elevada  $[\text{CO}_2]$  (barras verdes) y de plantas crecidas y medidas a elevada  $[\text{CO}_2]$  (barras grises). D0 representa la media de plantas regadas a lo largo de todo el estudio (barras oscuras); D9, D13 y D16 representan los días 9, 13 y 16, respectivamente, de plantas en sequía (barras claras). Los valores son la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes, repetido cada uno de ellos tres veces. Dentro del mismo día de medida, las diferencias significativas vienen representadas por diferentes letras a un nivel de significancia de  $P \leq 0,05$ .

La  $g_s$  fue significativamente diferente en plantas regadas (Fig. 4.7B). Esta diferencia en la  $g_s$  entre plantas regadas fue del 36% superior en plantas crecidas y medidas a elevada  $[\text{CO}_2]$  que en plantas crecidas bajo  $[\text{CO}_2]$  ambiental y medidas a elevada  $[\text{CO}_2]$ .

En plantas sometidas a sequía no se observaron diferencias significativas en la  $g_s$  entre plantas crecidas y medidas a elevada  $[\text{CO}_2]$  y plantas crecidas bajo  $[\text{CO}_2]$  ambiental y medidas a elevada  $[\text{CO}_2]$  salvo en el D16 donde se obtuvo una  $g_s$  significativamente superior (39%) en plantas crecidas bajo  $[\text{CO}_2]$  ambiental y medidas a elevada  $[\text{CO}_2]$  que en plantas crecidas y medidas a elevada  $[\text{CO}_2]$ .

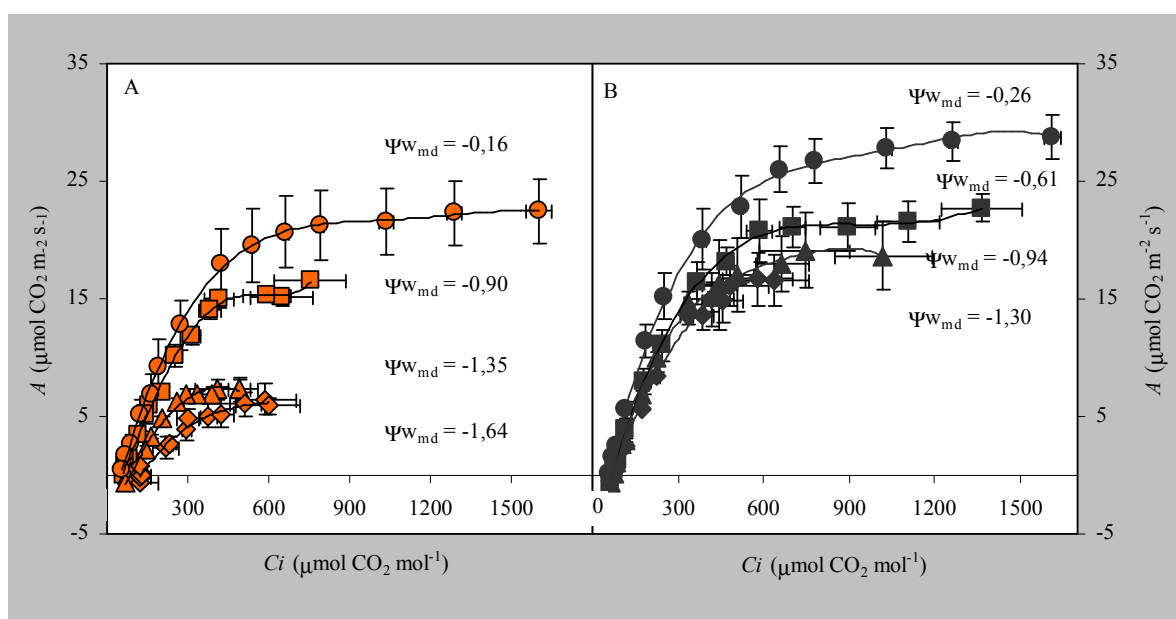
Sin embargo, el efecto directo del elevado  $\text{CO}_2$  sobre la  $g_s$  (Tabla 4.4) fue mayor en plantas regadas (cerca de un 60% de inhibición) que en las de sequía (55%, 16% y 7% después de 9, 13 y 16 días de sequía, respectivamente).

**Tabla 4.4.** Respuesta a lo largo del estudio de la aclimatación y del efecto neto y directo de la tasa fotosintética y la conductancia estomática al elevado CO<sub>2</sub>. Las letras “a” y “e” hacen referencia a las concentraciones de CO<sub>2</sub> de crecimiento, ambiental y elevada, respectivamente. Las letras “A” y “E” hacen referencia a las concentraciones de CO<sub>2</sub> de medida, ambiental y elevada, respectivamente. Entre corchetes se muestra el porcentaje de inhibición provocado por la sequía en las plantas crecidas a elevada [CO<sub>2</sub>]. D0 representa plantas regadas y D9, D13 y D16 plantas en sequía durante 9, 13 y 16 días, respectivamente.

| Tratamiento | Respuestas fotosintéticas ( $A$ , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) |                             |                          |      | Respuestas estomáticas ( $g_s$ , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) |                             |                          |      |
|-------------|--|-----------------------------|--------------------------|------|---|-----------------------------|--------------------------|------|
|             | Aclimatación<br>(e,E/a,E)  | Efecto Directo<br>(a,E/a,A) | Efecto Neto<br>(e,E/a,A) | [%]  | Aclimatación<br>(e,E/a,E)   | Efecto Directo<br>(a,E/a,A) | Efecto Neto<br>(e,E/a,A) | [%]  |
| <b>D0</b>   | 1,11   | 1,17                        | 1,29                     | [-]  | 1,36  | 0,42                        | 0,58                     | [-]  |
| <b>D9</b>   | 0,97   | 1,70                        | 1,64                     | [29] | 1,27  | 0,45                        | 0,57                     | [69] |
| <b>D13</b>  | 1,12   | 2,44                        | 2,73                     | [38] | 0,83  | 0,84                        | 0,70                     | [84] |
| <b>D16</b>  | 1,04   | 2,54                        | 2,64                     | [51] | 0,72  | 0,93                        | 0,67                     | [90] |

#### 4.2.1.4. Curvas $A/C_i$

El análisis mecanístico de las curvas  $A/C_i$  viene mostrado en la Fig. 4.8 y en la Tabla 4.5. La respuesta de la fotosíntesis neta a la concentración interna de  $\text{CO}_2$  bajo condiciones saturantes de luz ( $1200 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) fue mucho mayor en plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$ , a  $C_i$  mayores de  $150 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ , comparado con las plantas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental (Fig. 4.8). En plantas regadas, la  $A_{\text{max},C_i}$  y la  $CE$  de las plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$  aumentaron aproximadamente un 30% y un 45%, respectivamente, comparando con las plantas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental.



**Fig. 4.8.** **A)** Relación entre la asimilación fotosintética ( $A$ ) y la concentración interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) de plantas creciendo a  $[\text{CO}_2]$  ambiental (símbolos en color naranja). **B)** Relación entre la  $A$  y la  $C_i$  de plantas creciendo a elevada  $[\text{CO}_2]$  (símbolos en color negro). Los círculos se corresponden con plantas regadas (valor medio de los controles de todo el experimento) y los cuadrados, triángulos y rombos representan plantas en sequía durante 9, 13 y 16 días, respectivamente. Las líneas de tendencia se corresponden a funciones polinómicas de grado 2. Al lado de cada curva se representa el potencial hídrico, medido al mediodía, de cada tratamiento hídrico en el momento del análisis  $A/C_i$ .

La  $J_{\text{max}}$ , la  $V_{\text{cmax}}$  y la TPU (Tabla 4.5) también resultaron significativamente incrementadas por el elevado  $\text{CO}_2$ , en un 36%, 30% y 38%, respectivamente ( $P \leq 0,01$ ), indicando que no se produce una aclimatación fotosintética en las plantas bien regadas. La respiración a la luz ( $R_l$ ) y el punto de compensación de  $\text{CO}_2$  ( $\Gamma_{\text{CO}_2}$ ) aunque estadísticamente no se vieron modificados en las plantas creciendo a elevada  $[\text{CO}_2]$  sí

mostraron una ligera tendencia (~8%) a disminuir respecto a las crecidas bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental (Tabla 4.5). Los parámetros obtenidos *in vivo* directamente del análisis de las curvas *A/Ci* aparecen significativamente afectados ( $P \leq 0,01$ ) por el estrés hídrico aunque el efecto es mayor en plantas a [CO<sub>2</sub>] ambiental. El déficit hídrico causó una marcada reducción de la  $A_{max,Ci}$  (Tabla 4.5 y Fig. 4.8) en las plantas a [CO<sub>2</sub>] ambiental (72%) mayor que en las plantas a elevada [CO<sub>2</sub>] (42%) tras 16 días en sequía. Si analizamos la  $A_{max,Ci}$  cuando en ambas [CO<sub>2</sub>] el potencial hídrico alcanza un mismo valor (-1,30 MPa, tras 13 días de sequía en plantas a [CO<sub>2</sub>] ambiental y 16 días en sequía en plantas a elevada [CO<sub>2</sub>]), observamos que el efecto de la sequía es muy superior en plantas a [CO<sub>2</sub>] ambiental (60%). Los parámetros  $CE$ ,  $V_{cmax}$  y  $J_{max}$  (Tabla 4.5) fueron reducidos en un 60%, 66% y 77%, respectivamente, en condiciones de estrés hídrico y [CO<sub>2</sub>] ambiental. Las plantas a elevada [CO<sub>2</sub>] y mismo periodo de sequía mostraron menores reducciones: 38%, 31% y 24%, para  $CE$ ,  $J_{max}$  y  $V_{cmax}$ , respectivamente. La TPU (Tabla 4.5) disminuyó un 52% en plantas a [CO<sub>2</sub>] ambiental y un 40% en plantas a elevada [CO<sub>2</sub>]. Como anteriormente hemos analizado, para un mismo  $\Psi_w$ , -1,30 MPa, observamos que el efecto de la sequía en todos los parámetros de las curvas *A/Ci* fue entre un 20% y un 50% menos afectado en plantas a elevada [CO<sub>2</sub>] que en plantas a [CO<sub>2</sub>] ambiental. El estrés hídrico aumentó significativamente la  $L_s$  (Tabla 4.5) en ambas [CO<sub>2</sub>] pero más en plantas a [CO<sub>2</sub>] ambiental. En estas condiciones no hubo diferencias entre los tratamientos de sequía (un aumento medio del 100%). En plantas a elevada [CO<sub>2</sub>], la  $L_s$  aumentó aproximadamente un 40% después de 13 días sin riego. La  $L_m$  (Tabla 4.5) también se vio incrementada por el estrés hídrico en ambas [CO<sub>2</sub>] aunque en plantas a [CO<sub>2</sub>] ambiental fue de un 71% y en plantas a elevada [CO<sub>2</sub>] de un 38%.

**Tabla 4.5.** Tasa máxima de asimilación de carbono en condiciones saturantes de CO<sub>2</sub> (*Amax*, *Ci*, μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), eficiencia de carboxilación (*CE*, mol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), tasa máxima de transporte de electrones (*Jmax*, μmol e<sup>-</sup> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), tasa máxima de carboxilación de la Rubisco (*Vcmax*, μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), utilización de las triosas fosfato (TPU, μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), tasa de respiración a la luz (*Rl*, μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), punto de compensación del CO<sub>2</sub> (ΓCO<sub>2</sub>, μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>), limitación estomática relativa (*Ls*, %) y limitación mesofílica relativa (*Lm*, %) a la fotosíntesis y a la *Ci*.

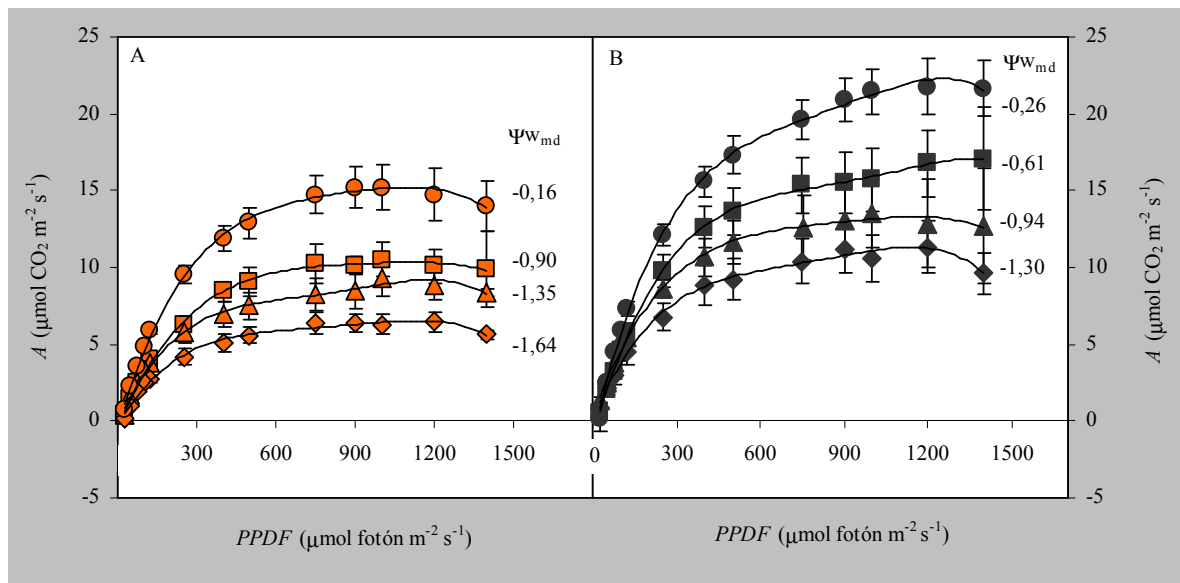
|                  | 350ppm        |               |               |               | 700ppm        |               |               |               |
|------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                  | D0            | D9            | D13           | D16           | D0            | D9            | D13           | D16           |
| <i>Amax,Ci</i>   | 22,4 ± 2,71   | 16,5 ± 0,43   | 7,35 ± 0,84   | 6,48 ± 1,33   | 28,75 ± 1,80  | 22,7 ± 1,18   | 19,1 ± 3,18   | 16,65 ± 2,26  |
| <i>CE</i>        | 0,061 ± 0,004 | 0,061 ± 0,004 | 0,034 ± 0,004 | 0,025 ± 0,004 | 0,089 ± 0,005 | 0,073 ± 0,003 | 0,069 ± 0,008 | 0,055 ± 0,004 |
| <i>Jmax</i>      | 111 ± 2,40    | 93,8 ± 4,60   | 49,6 ± 12,40  | 25,7 ± 11,70  | 151 ± 3,50    | 124 ± 9,50    | 104 ± 14,10   | 104 ± 7,60    |
| <i>Vcmax</i>     | 37,6 ± 1,30   | 35,9 ± 2,30   | 21 ± 2,60     | 12,6 ± 1,60   | 48,8 ± 1,40   | 43,8 ± 3,50   | 40,2 ± 1,90   | 37,3 ± 1,50   |
| TPU              | 8,13 ± 0,21   | 5,69 ± 0,70   | 4,41 ± 0,77   | 3,87 ± 0,77   | 11,2 ± 0,27   | 9,84 ± 1,63   | 7,09 ± 1,04   | 6,85 ± 0,60   |
| <i>Rl</i>        | 1,4 ± 0,30    | 1,8 ± 0,30    | 2,0 ± 0,90    | 2,8 ± 0,90    | 1,3 ± 0,40    | 2,5 ± 0,30    | 2,5 ± 0,30    | 2,2 ± 0,70    |
| ΓCO <sub>2</sub> | 58,3 ± 1,60   | 63,9 ± 3,90   | 83,6 ± 14,70  | 116,9 ± 48,60 | 53,9 ± 2,30   | 73 ± 5,70     | 72,7 ± 2,90   | 77,8 ± 7,20   |
| <i>Ls</i>        | 20,5 ± 1,30   | 46,9 ± 3,80   | 33,2 ± 2,60   | 41,2 ± 5,70   | 12,2 ± 1,50   | 13,8 ± 2,10   | 18,1 ± 3,50   | 15,7 ± 2,80   |
| <i>Lm</i>        | 0             | 17,4 ± 2,30   | 55,3 ± 9,30   | 71,1 ± 11,20  | 0             | 18,8 ± 2,60   | 28,5 ± 4,10   | 37,8 ± 7,30   |

| Parámetro        | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|------------------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| <i>Amax,Ci</i>   | ***             | ***                 | ***    | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |
| <i>CE</i>        | *               | n.s.                | n.s.   | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |
| <i>Jmax</i>      | ***             | ***                 | ***    | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | *  |
| <i>Vcmax</i>     | ***             | ***                 | *      | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |
| TPU              | **              | *                   | **     | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |
| <i>Rl</i>        | ***             | n.s.                | **     | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |
| ΓCO <sub>2</sub> | n.s.            | n.s.                | *      | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento.

#### 4.2.1.5. Curvas $A/PPDF$

La asimilación neta en función de la luz se muestra en la Fig. 4.9 y Tabla 4.6. En plantas regadas, la  $A_{max,luz}$  fue incrementada en un 45% aproximadamente en plantas a elevada  $[CO_2]$  comparado con las plantas de  $[CO_2]$  ambiental. Esta respuesta se hizo más acentuada cuando las plantas se sometían a restricción hídrica, alcanzando incrementos de hasta un 76% en plantas de elevada  $[CO_2]$  comparando con las plantas de  $[CO_2]$  ambiental después de 16 días de sequía.



**Fig. 4.9.** **A)** Relación entre la asimilación fotosintética ( $A$ ) y la intensidad de luz ( $PPDF$ ) de plantas creciendo a  $[CO_2]$  ambiental (símbolos en color naranja). **B)** Relación entre la  $A$  y la  $PPDF$  de plantas creciendo a elevada  $[CO_2]$  (símbolos en color negro). Los círculos se corresponden con plantas regadas (valor medio de los controles de todo el experimento) y los cuadrados, triángulos y círculos representan plantas en sequía durante 9, 13 y 16 días. Elevada  $[CO_2]$  en color gris oscuro y  $[CO_2]$  ambiental en color naranja. Las líneas de tendencia se corresponden a funciones polinómicas de grado 2. Al lado de cada curva se representa el potencial hídrico, medido al mediodía, de cada tratamiento hídrico en el momento del análisis  $A/PPDF$ .

El rendimiento cuántico de la asimilación de  $CO_2$  ( $\Phi_{CO_2}$ , Tabla 4.6) en plantas regadas aumentó de 0,049 a 0,086  $\mu mol CO_2 \mu mol^{-1} PPDF$ , de modo que fue un 75% mayor en plantas bajo elevada  $[CO_2]$  que en  $[CO_2]$  ambiental. Después de 16 días de sequía, el  $\Phi_{CO_2}$  disminuyó más en plantas a  $[CO_2]$  ambiental (65%) que en plantas a elevada  $[CO_2]$  (50%) y el punto de compensación a la luz ( $\bar{I}_{luz}$ ) aumentó un 20% en plantas de  $[CO_2]$  ambiental y un 10% en las de elevada  $[CO_2]$  tras la sequía más larga

(Tabla 4.6).

El punto de saturación de luz (PSL) (Tabla 4.6) fue afectado significativamente tanto por la  $[CO_2]$  ( $P \leq 0,05$ ) como por el T.e.t ( $P \leq 0,01$ ) y la sequía ( $P \leq 0,01$ ). En condiciones de riego el PSL fue un 5% superior en plantas bajo elevada  $[CO_2]$  que en plantas de  $[CO_2]$  ambiental. La sequía disminuyó el PSL un 46% tras 16 días de sequía en plantas creciendo bajo  $[CO_2]$  ambiental y un 28% en plantas bajo elevada  $[CO_2]$ . Las plantas en tratamiento de sequía y elevada  $[CO_2]$  siempre presentaron mayores valores de PSL, esto es un 6%, 5% y un 40% para los tratamientos D9, D13 y D16, respectivamente. La respiración (Tabla 4.6) fue prácticamente superior en plantas crecidas bajo elevada  $[CO_2]$  que en plantas de  $[CO_2]$  ambiental independientemente del régimen hídrico.

**Tabla 4.6.** Tasa máxima de asimilación de carbono en condiciones saturantes de luz ( $A_{max,luz}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), eficiencia fotoquímica de carboxilación ( $\Phi \text{CO}_2$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol}^{-1} \text{ fotones}$ ), punto de compensación de la luz ( $\Gamma_{luz}$ ,  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), punto de saturación de luz (PSL,  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y respiración a la oscuridad ( $Rd$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

|                    | 350ppm         |                |                |                | 700ppm         |                |                |                |
|--------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                    | D0             | D9             | D13            | D16            | D0             | D9             | D13            | D16            |
| $A_{max,luz}$      | 15,2 ± 1,53    | 10,5 ± 1,10    | 9,3 ± 1,16     | 6,4 ± 0,68     | 21,8 ± 2,07    | 17,0 ± 3,33    | 13,5 ± 2,20    | 11,3 ± 1,65    |
| $\Phi \text{CO}_2$ | 0,049 ± 0,016  | 0,036 ± 0,011  | 0,032 ± 0,012  | 0,017 ± 0,003  | 0,086 ± 0,017  | 0,070 ± 0,008  | 0,06 ± 0,008   | 0,042 ± 0,010  |
| $\Gamma_{luz}$     | 19,7 ± 0,65    | 20,3 ± 1,47    | 20,5 ± 1,76    | 23,7 ± 3,40    | 23,8 ± 1,54    | 24,2 ± 1,83    | 24,3 ± 4,97    | 26,3 ± 1,81    |
| PSL                | 304 ± 15,10    | 298 ± 51,01    | 232 ± 35,26    | 164 ± 63,80    | 318 ± 16,18    | 315 ± 23,63    | 243 ± 17,56    | 228 ± 79,26    |
| $Rd$               | -0,920 ± 0,252 | -1,100 ± 0,267 | -0,930 ± 0,268 | -2,400 ± 1,420 | -2,070 ± 0,767 | -1,670 ± 0,140 | -0,848 ± 0,238 | -2,170 ± 0,990 |

| Parámetro          | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|--------------------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| $A_{max,luz}$      | ***             | ***                 | ***    | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |
| $\Phi \text{CO}_2$ | *               | *                   | *      | n.s.                                  | n.s.                     | **                           | n.s.   |
| $\Gamma_{luz}$     | n.s.            | n.s.                | n.s.   | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | *  |
| PSL                | *               | **                  | **     | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |
| $Rd$               | n.s.            | *                   | n.s.   | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | *  |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo

<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento.



### 4.2.2. Fluorescencia

La eficiencia máxima del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) no fue afectada significativamente ni por la  $[CO_2]$  ni por la sequía. Las plantas bien regadas mostraron un  $F_v/F_m$  cercano a 0,8, valor que se considera como un indicativo de buen estado fisiológico (Tabla 4.7). Bajo estrés hídrico, las plantas experimentaron una reducción de tan sólo un 16% tras 16 días de sequía a  $[CO_2]$  ambiental, y una reducción aún inferior (8%) en plantas en sequía a elevada  $[CO_2]$ .

Tampoco se encontraron diferencias significativas en el  $\Phi PSII$  entre las plantas regadas a diferente  $[CO_2]$  (Tabla 4.7). En cambio, el estrés hídrico provocó un marcado descenso en el  $\Phi PSII$  que varió en función de la  $[CO_2]$ . Después de 16 días sin riego, las plantas de  $[CO_2]$  ambiental mostraron un 36% menos de  $\Phi PSII$  mientras que, durante el mismo periodo de sequía, las plantas de elevada  $[CO_2]$  presentaron un descenso del 25%. Por otro lado, la eficiencia de captura y transducción de la energía lumínica,  $F'_v/F'_m$ , fue un 12% superior en plantas regadas de elevada  $[CO_2]$  que en plantas regadas bajo  $[CO_2]$  ambiental aunque el efecto del  $CO_2$  no fue significativo sobre este parámetro. En plantas en sequía durante 16 días  $F'_v/F'_m$  disminuyó por efecto de la sequía un 6% en plantas de elevada  $[CO_2]$  y aumentó un 7% en plantas de  $[CO_2]$  ambiental, de forma que tampoco ejerció un efecto significativo sobre la eficiencia instantánea del fotosistema II.

El  $qP$  no fue significativamente diferente entre plantas de diferente  $[CO_2]$  (Tabla 4.7). La sequía produjo un descenso del  $qP$  del 39% en plantas de  $[CO_2]$  ambiental y del 20% a elevada  $[CO_2]$ . Por otro lado, el  $NPQ$  tampoco fue significativamente modificado por el  $CO_2$  (< 8%) en plantas regadas, indicando que no hubo cambios importantes en los mecanismos de disipación no fotoquímica de energía en plantas creciendo en condiciones de elevada  $[CO_2]$ . Sin embargo, la alta variabilidad de los datos hace difícil discernir una tendencia clara del  $NPQ$  cuando las plantas están en sequía. El  $NPQ$  aumentó aproximadamente un 60% en plantas de  $[CO_2]$  ambiental y un 20% en plantas a elevada  $[CO_2]$  tras 13 días en sequía, pero tras este periodo el  $NPQ$  comenzó a descender (Tabla 4.7).

**Tabla 4.7.** Parámetros de fluorescencia de la clorofila *a*. Eficiencia máxima del fotosistema II en plantas adaptadas a oscuridad ( $F_v/F_m$ ), eficiencia fotoquímica del PSII en plantas iluminadas ( $\Phi_{PSII}$ ), quenching fotoquímico ( $qP$ ), quenching no fotoquímico ( $NPQ$ ), eficiencia instantánea del fotosistema II en plantas iluminadas ( $F'_v/F'_m$ ) y proporción del flujo total de transporte de electrones ( $ETR-Jt$ ) destinados a carboxilación ( $Jc$ ) y oxigenación ( $Jo$ ). Condiciones de crecimiento y análisis estadístico como en Tabla 4.2.

| 350ppm        |               |               |               |               |               |               |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|               | D0            | D9            | D13           | D16           | R1            | R2            |
| $F_v/F_m$     | 0,821 ± 0,004 | 0,805 ± 0,007 | 0,741 ± 0,032 | 0,692 ± 0,095 | 0,803 ± 0,006 | 0,784 ± 0,011 |
| $\Phi_{PSII}$ | 0,607 ± 0,011 | 0,536 ± 0,072 | 0,462 ± 0,048 | 0,391 ± 0,051 | 0,574 ± 0,016 | 0,574 ± 0,030 |
| $qP$          | 0,908 ± 0,010 | 0,817 ± 0,080 | 0,685 ± 0,058 | 0,547 ± 0,031 | 0,788 ± 0,021 | 0,808 ± 0,036 |
| $NPQ$         | 0,356 ± 0,038 | 0,492 ± 0,130 | 0,578 ± 0,114 | 0,230 ± 0,049 | 0,355 ± 0,030 | 0,332 ± 0,029 |
| $F'_v/F'_m$   | 0,668 ± 0,007 | 0,656 ± 0,035 | 0,674 ± 0,028 | 0,715 ± 0,087 | 0,728 ± 0,008 | 0,708 ± 0,017 |
| $ETR-Jt$      | 101 ± 2       | 90 ± 12       | 78 ± 8        | 65 ± 9        | 96 ± 3        | 96 ± 5        |
| $Jc$          | 69,8          | 52,7          | 40,1          | 35,7          | 63,7          | 61,3          |
| $Jo$          | 31,2          | 37,3          | 37,9          | 29,3          | 32,3          | 34,7          |

| 700ppm        |               |               |               |               |               |               |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|               | D0            | D9            | D13           | D16           | R1            | R2            |
| $F_v/F_m$     | 0,809 ± 0,007 | 0,808 ± 0,007 | 0,802 ± 0,005 | 0,740 ± 0,037 | 0,803 ± 0,009 | 0,792 ± 0,004 |
| $\Phi_{PSII}$ | 0,665 ± 0,020 | 0,607 ± 0,023 | 0,519 ± 0,018 | 0,499 ± 0,019 | 0,506 ± 0,037 | 0,592 ± 0,029 |
| $qP$          | 0,887 ± 0,022 | 0,829 ± 0,030 | 0,761 ± 0,029 | 0,708 ± 0,052 | 0,737 ± 0,038 | 0,822 ± 0,031 |
| $NPQ$         | 0,382 ± 0,052 | 0,450 ± 0,049 | 0,458 ± 0,116 | 0,215 ± 0,011 | 0,486 ± 0,137 | 0,223 ± 0,051 |
| $F'_v/F'_m$   | 0,750 ± 0,013 | 0,732 ± 0,008 | 0,682 ± 0,019 | 0,705 ± 0,047 | 0,690 ± 0,022 | 0,719 ± 0,012 |
| $ETR-Jt$      | 112 ± 4       | 95 ± 5        | 87 ± 3        | 83 ± 4        | 86 ± 6        | 100 ± 5       |
| $Jc$          | 83            | 67,7          | 59,7          | 51,1          | 67,3          | 71,9          |
| $Jo$          | 29            | 27,3          | 27,3          | 31,9          | 18,7          | 28,1          |

**Tabla 4.7.** Continuación

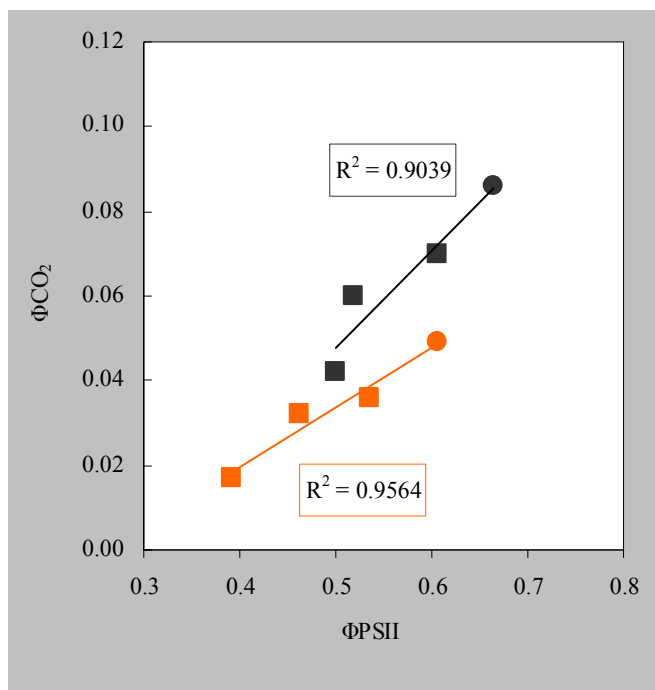
| Parámetro     | CO <sub>2</sub> | Sequía | CO <sub>2</sub> x Sequía |
|---------------|-----------------|--------|--------------------------|
| $F_v/F_m$     | n.s.            | **     | n.s.                     |
| $\Phi_{PSII}$ | n.s.            | *      | *                        |
| $qP$          | n.s.            | n.s.   | n.s.                     |
| $NPQ$         | n.s.            | n.s.   | n.s.                     |
| $F'v/F'm$     | n.s.            | **     | n.s.                     |
| $ETR(Jt)$     | n.s.            | *      | *                        |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo

Las tasas de transporte de electrones a través del PSII,  $Jt$  y  $Jc$ , aumentaron un 11% y un 19%, respectivamente, para plantas a elevada [CO<sub>2</sub>] comparadas con plantas de [CO<sub>2</sub>] ambiental (Tabla 4.7). El elevado CO<sub>2</sub> redujo (5%) el desvío de electrones hacia la fotorrespiración ( $Jo$ ).

Tras 16 días de sequía,  $Jt$  descendió un 36% en plantas de [CO<sub>2</sub>] ambiental y un 26% bajo elevada [CO<sub>2</sub>]. El flujo de electrones hacia la carboxilación ( $Jc$ ) disminuyó en un 49% y un 38% en plantas de [CO<sub>2</sub>] ambiental y elevada [CO<sub>2</sub>], respectivamente. Consecuentemente, el porcentaje de flujo oxidativo ( $Jo/Jt$ ) aumentó con la sequía bajo ambas [CO<sub>2</sub>].

La respuesta del  $\Phi_{PSII}$  vs.  $\Phi_{CO_2}$  se muestra en la Fig. 4.10. El  $\Phi_{CO_2}$  se correlacionó positivamente con el  $\Phi_{PSII}$  bajo ambas [CO<sub>2</sub>] y también fue influenciada por el régimen hídrico. Para una eficiencia fotoquímica similar, el  $\Phi_{CO_2}$  fue mayor en plantas de elevada [CO<sub>2</sub>] confirmando que, bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental y estrés hídrico, una gran parte del transporte de electrones estaba dirigido hacia reacciones no carboxilantes. El estrés hídrico causó un efecto más severo en la  $\Phi_{CO_2}$  (80% y un 59% de inhibición) que sobre  $\Phi_{PSII}$  (reducción del 36% y 25%) bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental y elevada, respectivamente, sugiriendo que otros procesos diferentes al transporte de electrones son los que están limitando la asimilación de CO<sub>2</sub>.



**Fig. 4.10.** Relación entre la eficiencia fotoquímica de carboxilación de CO<sub>2</sub> ( $\Phi\text{CO}_2$ ) y la eficiencia fotoquímica de transporte de electrones del fotosistema II ( $\Phi\text{PSII}$ ). Los círculos se corresponden con plantas regadas en el día 0 del experimento y los cuadrados representan plantas en sequía durante 9, 13 y 16 días. Elevada [CO<sub>2</sub>] en color gris y [CO<sub>2</sub>] ambiental en color naranja. Las líneas de tendencia y el factor de correlación se corresponden a funciones lineales.

### 4.2.3. Pigmentos fotosintéticos

El contenido en pigmentos se muestra en la Tabla 4.8. Tanto la [CO<sub>2</sub>] como la sequía y el tiempo de exposición al tratamiento de las plantas tuvieron un efecto significativo sobre la clorofila *a* y sobre la clorofila *b* ( $P \leq 0,001$ ). La concentración de clorofila *a* expresada por área disminuyó respecto a sus controles un 15%, 18% y 50% en condiciones de [CO<sub>2</sub>] ambiental y descendió un 10%, 10% y 19% a elevada [CO<sub>2</sub>] por efecto de la sequía tras 9, 13 y 16 días, respectivamente. La sequía también hizo descender el contenido en clorofila *b* un 28%, 25% y 50% en condiciones de [CO<sub>2</sub>] ambiental y un 7%, 16% y 30% a elevada [CO<sub>2</sub>] tras 9, 13 y 16 días, respectivamente.

El efecto de la [CO<sub>2</sub>] sobre las plantas regadas fue positivo para la clorofila *a* y la clorofila *b*, puesto que se obtuvo un 23% y un 16% más de clorofila *a* y *b*, respectivamente a elevada [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental al final del estudio. La [CO<sub>2</sub>] tuvo un efecto positivo también sobre las plantas en sequía.

**Tabla 4.8.** Interacción entre la  $[CO_2]$  y la disponibilidad hídrica en el contenido de pigmentos fotosintéticos: clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides (carotenos y xantofilas). Unidades:  $\mu g\ cm^{-2}$ . Plantas crecidas en condiciones de riego (C), en sequía progresiva (S) y en recuperación tras 9 días de sequía (R1) o en recuperación tras 13 días de sequía (R2). Los valores son la media  $\pm$  ES de al menos tres experimentos independientes cada uno de ellos repetido tres veces.

|            |    | Clorofila <i>a</i> |                 | Clorofila <i>b</i> |                    | Carotenoides       |                    |
|------------|----|--------------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Días Riego |    | 350ppm             | 700ppm          | 350ppm             | 700ppm             | 350ppm             | 700ppm             |
| 0          | C  | 37 $\pm$ 3,54 a    | 37 $\pm$ 2,05 a | 14,1 $\pm$ 1,23 a  | 15,8 $\pm$ 1,16 a  | 6,32 $\pm$ 0,68 a  | 5,52 $\pm$ 0,42 a  |
| 9          | C  | 39 $\pm$ 0,71 a    | 42 $\pm$ 5,32 a | 17,5 $\pm$ 0,95 a  | 17,5 $\pm$ 2,14 a  | 7,91 $\pm$ 0,42 b  | 6,04 $\pm$ 0,64 ab |
|            | S  | 33 $\pm$ 2,12 a    | 34 $\pm$ 3,55 a | 13,0 $\pm$ 1,04 a  | 14,8 $\pm$ 1,52 a  | 6,40 $\pm$ 0,51 ab | 5,65 $\pm$ 0,46 a  |
| 13         | C  | 39 $\pm$ 2,31 a    | 40 $\pm$ 1,01 a | 15,7 $\pm$ 1,37 ab | 17,5 $\pm$ 1,21b   | 6,39 $\pm$ 0,61 a  | 5,89 $\pm$ 0,44 a  |
|            | S  | 32 $\pm$ 2,27 a    | 36 $\pm$ 2,04 a | 11,8 $\pm$ 0,59 a  | 14,7 $\pm$ 1,02 b  | 6,84 $\pm$ 0,28 a  | 5,92 $\pm$ 0,54 a  |
| 16         | C  | 34 $\pm$ 2,27 b    | 42 $\pm$ 2,31 b | 13,9 $\pm$ 0,54 bc | 16,2 $\pm$ 0,75 bc | 6,91 $\pm$ 0,14 a  | 5,97 $\pm$ 0,32 a  |
|            | S  | 17 $\pm$ 2,96 a    | 34 $\pm$ 1,75 b | 6,9 $\pm$ 0,80 a   | 11,3 $\pm$ 0,75 ab | 7,17 $\pm$ 0,80 a  | 6,11 $\pm$ 0,39 a  |
|            | R1 | 35 $\pm$ 3,30 b    | 44 $\pm$ 6,24 b | 13,5 $\pm$ 0,84 bc | 18,7 $\pm$ 3,20 c  | 6,25 $\pm$ 0,93 a  | 6,16 $\pm$ 0,44 a  |
|            | R2 | 37 $\pm$ 2,31b     | 39 $\pm$ 2,87 b | 14,3 $\pm$ 1,30 bc | 15,2 $\pm$ 1,28 bc | 6,48 $\pm$ 0,80 a  | 6,53 $\pm$ 0,39 a  |

| Parámetro    | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|--------------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| Chl <i>a</i> | ***             | **                  | ***    | *                                     | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |
| Chl <i>b</i> | ***             | ***                 | ***    | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |
| Carotenoides | **              | n.s.                | n.s.   | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |

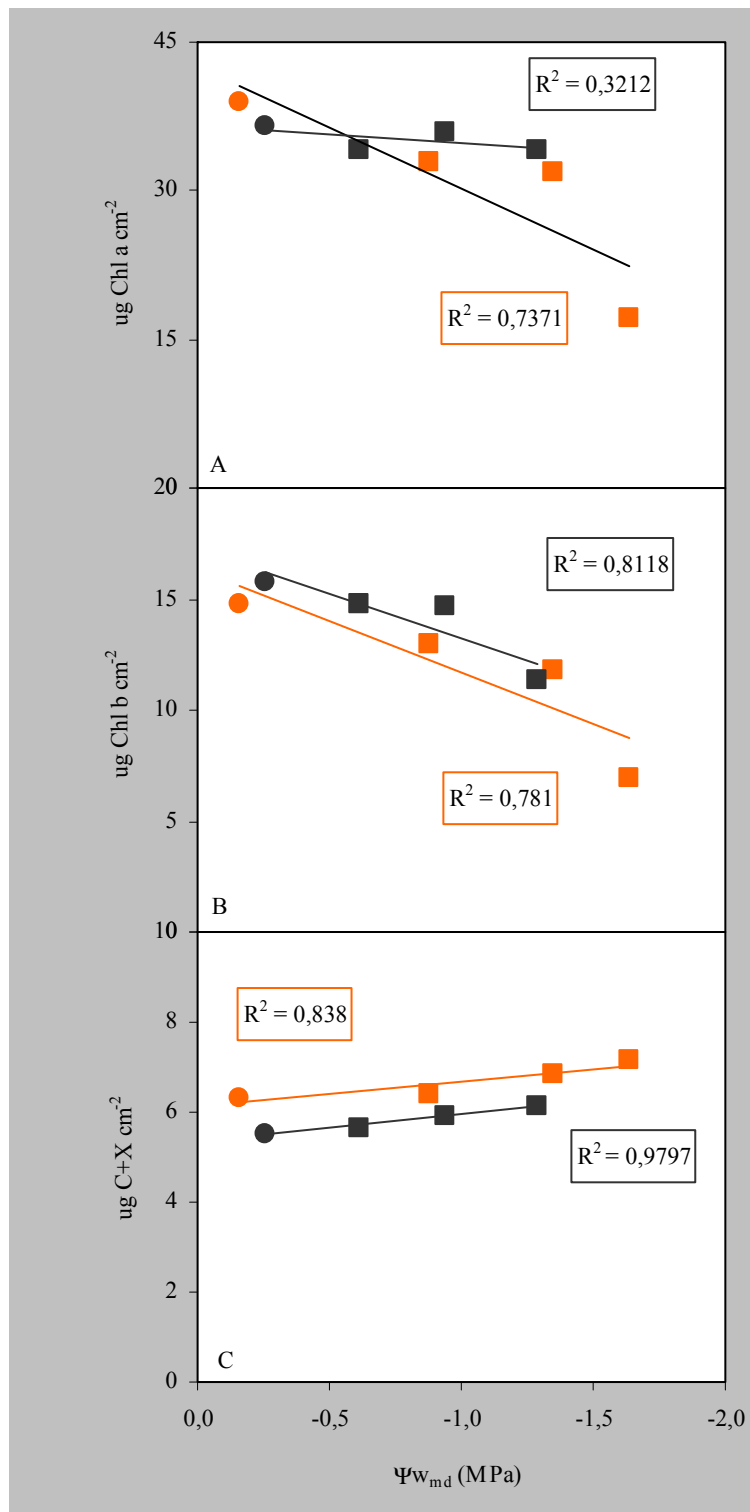
El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento

Se observó un 3%, 13% y un 100% más de clorofila *a* bajo elevada  $[CO_2]$  que bajo  $[CO_2]$  ambiental para los tratamientos de 9, 13 y 16 días en sequía, respectivamente. Esta misma respuesta presentó también la clorofila *b*, siendo en general la diferencia mayor. Se observó un 14%, 25% y un 64% más de clorofila *b* para los tratamientos de 9, 13 y 16 días en sequía y elevada  $[CO_2]$  que a  $[CO_2]$  ambiental.

En lo referente al contenido de carotenoides (Tabla 4.8) se pudo observar que la sequía hizo aumentar discretamente su concentración tras 16 días de ausencia de riego. En cambio, sí se obtuvo un efecto significativo de la  $[CO_2]$  ( $P \leq 0,01$ ). En condiciones de elevada  $[CO_2]$  y riego las plantas regadas presentaron una cantidad de carotenoides un 11% menor que en plantas de  $[CO_2]$  ambiental. El  $CO_2$  también tuvo efecto en las plantas sometidas a sequía puesto que el contenido de carotenoides en las plantas a elevada  $[CO_2]$  fue un 11%, 13% y un 15% superior que a  $[CO_2]$  ambiental, tras 9, 13 y 16 días (Tabla 4.8).

Al analizar el efecto del  $CO_2$  sobre el contenido de pigmentos en plantas con un mismo estado hídrico, independientemente del tiempo de exposición al tratamiento,

observamos que los valores de clorofila *a* fueron ligeramente superiores a elevada [CO<sub>2</sub>], un 9% y un 6% para  $\Psi_{w_{md}}$  de -0,9MPa y -1,3MPa, respectivamente (Fig. 4.11A). En el caso de la clorofila *b*, observamos que para un  $\Psi_{w_{md}}$  de -0,9MPa el contenido fue en torno a un 13% más alto a elevada [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental. En cambio, para un  $\Psi_{w_{md}}$  de -1,3MPa los valores fueron similares (Fig. 4.11B). En lo referente a los carotenoides, para  $\Psi_{w_{md}}$  similares de -0,9MPa y -1,3MPa, el contenido fue un 8% y un 12% superior, respectivamente, bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental que bajo elevada [CO<sub>2</sub>] (Fig. 4.11C).



**Fig. 4.11.** A) Correlación entre el contenido en clorofila *a* (Chl *a*) y el potencial hídrico al mediodía ( $\Psi_{w_{md}}$ ), B) entre el contenido en clorofila *b* (Chl *b*) y el potencial hídrico al mediodía ( $\Psi_{w_{md}}$ ), C) entre el contenido en carotenoides (C+X) y el potencial hídrico al mediodía ( $\Psi_{w_{md}}$ ). Los círculos se corresponden con plantas regadas al inicio del estudio y los cuadrados representan plantas en sequía durante 9, 13 ó 16 días. Elevada  $[CO_2]$  en color gris y  $[CO_2]$  ambiental en color naranja. Las líneas de tendencia y los factores de correlación se corresponden con funciones lineales.

## 4.3. Discusión

### 4.3.1. Intercambio gaseoso

Las tasas de intercambio gaseoso en plantas bajo ambas  $[CO_2]$  disminuyeron con el tiempo de ensayo ( $P \leq 0,001$ ) (Fig. 4.1). Resultados similares fueron observados por [Sicher y Bunce \(1997\)](#) y por [Sicher \(1998\)](#). Como la mayoría de las especies, la cebada creciendo a elevada  $[CO_2]$  mostró una reducida  $g_s$  (descenso del 40%; Fig. 4.1A) como consecuencia del cierre estomático parcial. Igualmente, ha sido publicado que en plantas herbáceas la reducción de  $g_s$  bajo elevada  $[CO_2]$  suele estar entre un 27% y un 40% ([Field et al., 1995](#)). El aumento de  $C_i$  (Fig. 4.2A) originado por la elevada  $[CO_2]$  puede provocar el cierre parcial de los estomas. Sin embargo, el mecanismo por el cual los estomas responde a la señal del  $CO_2$  permanece bajo discusión. [Webb et al. \(1996\)](#) postularon que el elevado  $CO_2$  causaba un aumento del nivel de calcio libre en el citosol de las células guarda. El nivel de iones calcio participa como mensajero secundario en la ruta de la señal de transducción responsable del control del turgor de las células guarda ([Hetherington, 2001](#); [Webb et al., 2001](#)). Por su parte, [Zeiger et al. \(2002\)](#) postularon que el aumento de  $[CO_2]$  ambiental incrementa la tasa de fijación de  $CO_2$ , alcalinizando el lumen del cloroplasto y disminuyendo el contenido de zeaxantina de la célula guarda, la cual activa una ATPasa de la membrana plasmática de la célula guarda. La salida de protones al apoplasto la acidifica, activándose la toma de iones y la apertura estomática. De esa manera, se explicaría el cierre estomático en las plantas crecidas a elevada  $[CO_2]$  en relación a las crecidas a  $[CO_2]$  ambiental. Por otro lado, pudimos observar que el cierre estomático responde a la disminución de la hidratación edáfica (Fig. 4.1A). Según [Medrano et al. \(1997\)](#) la  $g_s$  puede reducirse, en respuesta al déficit hídrico, hasta un 25% de la máxima sin que se detecten caídas de potencial hídrico en las hojas. Por el contrario, ha sido constatado que el nivel mínimo para que al descender el  $\Psi_w$  disminuya la apertura estomática oscila entre  $-0,70$  y  $-1,20$  MPa ([Ackerson, 1985](#); [Hsiao, 1973](#); [Markhart, 1985](#); [Oosterhuis y Wullschleger, 1987](#)) aunque nosotros pudimos observar que ya alrededor de  $-0,50$  MPa la  $g_s$  respondía disminuyendo. A medida que el suelo se va secando, el nivel de ácido abscísico (ABA) de la planta aumenta, y esto podría inducir la reducción de  $g_s$ , mediado por los niveles de  $Ca^{2+}$  que controlan los canales aniónicos en la membrana plasmática ([Assmann, 1999](#)



y las referencias que en él aparecen). Por consiguiente, no es de sorprender que las plantas creciendo a elevada  $[\text{CO}_2]$  en suelos deshidratados muestren mayor cierre estomático que las plantas que lo hacen a  $[\text{CO}_2]$  ambiental (Dubbe et al., 1978). Por lo tanto, se da un cierre estomático mayor, una transpiración menor (Figs. 4.1 y 4.2) y una conservación mayor del agua del suelo (Fig. 3.1). Adicionalmente, la reducción de la  $g_s$  inducida por el elevado  $\text{CO}_2$  produce un mayor  $\Psi_w$  (Fig. 3.4). La elevada  $[\text{CO}_2]$  disminuye la apertura estomática, lo que puede reducir el uso de agua por parte de la planta e, indirectamente, mejorar el rendimiento mediante el retraso del estrés hídrico. Si la conductancia estomática reduce el uso del agua y retrasa la sequía provocada por periodos cortos sin riego, mediante la conservación de la humedad del suelo, también podría mejorarse la productividad del cultivo (Ghannoum et al., 2000).

Según estudios realizados por Wong et al. (1978) y Drake et al. (1997), las plantas tienden a preservar una relación constante entre  $C_i$  y  $C_a$ , independientemente de la  $[\text{CO}_2]$  del entorno: en nuestro caso 0,74 a 350  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  vs. 0,75 a 700  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  en condiciones de riego (Tabla 4.1). Sin embargo, esta proporción varió cuando se analizó en plantas sometidas a sequía: 0,31 en plantas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental y 0,40 en plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$ , siendo la disponibilidad del agua en el suelo un 75% en ambas  $[\text{CO}_2]$ . Igualmente, Broribb (1996) observó una correlación alta de  $C_i/C_a$  cuando las plantas en estudio se mantenían en riego y una correlación mucho menor cuando se sometían dichas plantas a sequía. Este valor de  $C_i/C_a$  mayor en plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$  alcanzado a un mismo estrés hídrico permitió a las plantas que presentaran mayores tasas de  $A$ .

Aunque el elevado  $\text{CO}_2$  causó cierre estomático, esta mayor concentración de dióxido de carbono permitió a las plantas posponer la restricción impuesta por los estomas. De este modo, como se ha descrito anteriormente, la elevada  $[\text{CO}_2]$  aumentó la  $C_i$  y mejoró la  $A$  (Figs. 4.2A y 4.1C). La estimulación de la  $A$  llevada a cabo por el elevado  $\text{CO}_2$  fue incluso mayor en plantas de sequía comparando con las de riego. Se ha observado una mejora de la tasa de fotosíntesis neta en plantas C3 (17%-29%) en experimentos llevados a cabo bajo condiciones controladas de elevado  $\text{CO}_2$  (Kimball, 1983; Allen et al., 1987). Se sabe que tanto la sequía como el elevado  $\text{CO}_2$  son factores que disminuyen el contenido y la actividad Rubisco, aunque la reducción de la actividad Rubisco provocada por la sequía parece ser menor a mayor  $[\text{CO}_2]$  (Vu et al., 1998).

Como consecuencia de que las tasas fotosintéticas también se correlacionan estrechamente con el contenido hídrico del suelo, la disponibilidad del agua edáfica

juega un papel importante en la regulación de las tasas de  $A$  bajo ambas concentraciones de  $\text{CO}_2$  y sequía. Sin embargo, a pesar de que en este estudio se hallaron correlaciones significativas entre el  $\Psi_{\text{wmd}}$  y los parámetros de intercambio gaseoso:  $g_s$ ,  $A$ ,  $C_i$ ,  $E$  en ambas  $[\text{CO}_2]$  (Fig. 4.3), se registró claramente una mayor  $A$  en plantas de elevado  $\text{CO}_2$  para un mismo  $\Psi_{\text{w}}$ . El retraso de 3-4 días en la pérdida de agua del suelo que se experimentó en condiciones de elevado  $\text{CO}_2$  podría prolongar el periodo de fotosíntesis durante la sequía. Por otro lado, el aumento en la  $[\text{CO}_2]$  atmosférico alteró las tasas de pérdida de agua transpiracional (Fig. 4.2C). La sensibilidad estomática al  $\text{CO}_2$  condujo a una reducción de  $g_s$  y esto contribuyó a la reducción de la  $E$  observada en las plantas de elevado  $\text{CO}_2$ .

Se observó un aumento en la  $ITE$  (Tabla 4.2) como resultado de la reducción de  $E$  y de una  $A$  mayor cuando las plantas estaban expuestas a elevado  $\text{CO}_2$ . A semejanza con nuestros resultados, existen otros trabajos que muestran aumentos en la eficiencia transpiratoria en un rango de 25%-230% como consecuencia tanto de la reducción estomática como de la mejora en la asimilación (Eamus, 1991; Drake et al., 1997; Saxe et al., 1998). En condiciones de riego y elevada  $[\text{CO}_2]$  aumentó la  $A$  mientras que al cerrarse los estomas disminuyó la transpiración y por tanto la relación  $A/E$  se incrementó. La sequía bajo ambas  $[\text{CO}_2]$  hizo aumentar la  $ITE$  debido a que disminuyó más la  $E$  que la  $A$ . Este es un hecho que se observa en muchas especies como una estrategia para soportar la sequía (Flexas et al., 1998 y 2002). Sin embargo se observaron diferencias entre ambas  $[\text{CO}_2]$  en condiciones de sequía debidas a que, para un mismo nivel de estrés hídrico ( $\Psi_{\text{wmd}}$  similar), las plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$  asimilaban más, transpiraban menos y por tanto la  $ITE$  aumentó.

El rendimiento cuántico ( $\Phi$ ) o eficiencia fotosintética en función de los fotones absorbidos (Tabla 4.3 y Fig. 4.6A) describe la pendiente inicial de una curva de saturación de luz. Las plantas C3 tienen un  $\Phi$  de 0,05 en condiciones naturales (que corresponde a una molécula de  $\text{CO}_2$  fijado por 20 fotones absorbidos); si se elimina la fotorrespiración mediante elevada  $[\text{CO}_2]$  el  $\Phi$  aumenta a 0,07-0,08 (1  $\text{CO}_2$  por 12-14 fotones) (Mc Donald, 2003). En las condiciones experimentales del presente trabajo el  $\Phi$  aumentó un 33% por efecto de la elevada  $[\text{CO}_2]$  en condiciones de riego, si bien el mayor aumento de  $\Phi$  se observó en condiciones de sequía y elevada  $[\text{CO}_2]$  (164% respecto al de plantas en sequía y  $[\text{CO}_2]$  ambiental). Estos resultados demuestran que la estabilidad del funcionamiento del transporte de electrones en el cloroplasto se

mejoraba en condiciones de elevada  $[\text{CO}_2]$  tanto si se regaban las plantas como si se mantenían en sequía, donde se vio que el efecto fue aún mayor.

El requerimiento cuántico,  $RQ$ , indica la cantidad de fotones que necesita la planta para fijar un mol de  $\text{CO}_2$  y es, por tanto, un indicador de la eficiencia en el uso de la luz por la planta. Las plantas de elevada  $[\text{CO}_2]$  fijaron más  $\text{CO}_2$  por  $\mu\text{mol}$  de fotones recibidos, por tanto presentaron un rendimiento fotosintético superior que bajo  $[\text{CO}_2]$  ambiental (Tabla 4.3 y Fig. 4.6B). Un aumento del  $RQ$  por efecto de la senescencia viene en paralelo a la disminución de la fotosíntesis neta que mostraron las plantas regadas a lo largo del experimento (Fig. 4.1C). Por otro lado, al obtener un fuerte descenso en el rendimiento cuántico cuando el potencial hídrico era cada vez más negativo, el requerimiento cuántico fue cada vez mayor.

### 4.3.2. Aclimatación al $\text{CO}_2$

Si la exposición a altas  $[\text{CO}_2]$  se mantiene durante un periodo de tiempo prolongado los primeros efectos benéficos pueden comenzar a declinar (Jauhainen y Silvola, 1996) y pueden aparecer los signos de aclimatación del sistema fotosintético (Sicher y Kremer, 1996; Drake et al., 1997). En cebada, especie  $\text{C}_3$ , la fotosíntesis está limitada por el  $\text{CO}_2$ , substrato de la Rubisco, y un aumento de éste estimula la fotosíntesis. Sin embargo, dicha estimulación depende también de otros factores ambientales tales como la sequía, lo que significa que este aumento de la fotosíntesis y su perdurabilidad en respuesta al elevado  $\text{CO}_2$  podría verse afectado por la disponibilidad de agua edáfica (Körner, 2000; Volk et al., 2000).

Cuando el análisis fotosintético fue llevado a cabo a la misma  $[\text{CO}_2]$ ,  $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ , tanto en plantas crecidas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental como en plantas crecidas a elevada  $[\text{CO}_2]$ , la capacidad fotosintética no mostró una respuesta de aclimatación, ni en plantas regadas ni en plantas de sequía (Fig. 4.7). Este resultado se encuentra en contraposición con el hallado por Sicher (1998) y Bunce (2001), quienes observaron una reducción de la tasa neta de fijación de  $\text{CO}_2$  en hojas de cebada creciendo a elevada  $[\text{CO}_2]$  y medidas a elevada  $[\text{CO}_2]$  comparando con las plantas de cebada crecidas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental y medidas a elevada  $[\text{CO}_2]$ . Esta diferencia puede ser debida a la mayor cantidad de nitrato aportado en la solución de riego (20mM) utilizada en nuestro estudio. Stitt y Krapp (1999) postularon que la aclimatación de la fotosíntesis podría tener relación con

un aporte insuficiente de N, y [Farage et al. \(1998\)](#) no observaron aclimatación cuando la aportación de N se hacía a un nivel óptimo continuo. Por consiguiente, el alto nivel de nitrógeno aportado en nuestro experimento ha podido tener relación con la no regulación a la baja de la fotosíntesis, como también ha sido referenciado en otros experimentos con aporte de abundante N ([Curtis, 1996](#); [Rogers et al., 1998](#); [Farage et al., 1998](#)).

Por lo que respecta a la respuesta estomática frente al elevado CO<sub>2</sub>, la *g<sub>s</sub>* en plantas regadas descendió marcadamente y, a medida que el suelo se iba secando, descendió de forma gradual. Mientras que tanto la aclimatación estomática (Tabla 4.4) como la respuesta directa de *g<sub>s</sub>* a la elevada [CO<sub>2</sub>] variaron con la sequía, los tratamientos con mayor efecto aclimatorio sobre la *g<sub>s</sub>* fueron los que menor respuesta directa presentaban. Resultados similares obtuvo [Bunce \(2001\)](#) en los que también concluyó que la aclimatación a la fotosíntesis que observan en patata, trigo y cebada sucedía con una ligera evidencia de aclimatación estomática y, en cambio, en sorgo, se apreció aclimatación estomática sin atisbos de aclimatación fotosintética. Sin embargo, las plantas regadas no mostraron aclimatación, al igual que [Leakey et al. \(2006\)](#) tampoco observaron aclimatación de la *g<sub>s</sub>* en soja a elevada [CO<sub>2</sub>].

En plantas sometidas a sequía no se observaron diferencias significativas en la *g<sub>s</sub>* salvo en el D16 donde se obtuvo una *g<sub>s</sub>* significativamente superior (39%) en plantas crecidas bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental y medidas a elevada [CO<sub>2</sub>] que en plantas crecidas y medidas a elevada [CO<sub>2</sub>], por tanto, la doble [CO<sub>2</sub>] causó una leve aclimatación estomática en el último día de sequía (Tabla 4.4 y Fig. 4.7). Según [Bunce \(2000\)](#) una regulación a la baja de la conductancia estomática ocurriría en mayor medida cuanto menor es el déficit de presión de vapor. Aunque ha sido observada una leve reducción generalizada en la *g<sub>s</sub>*, la no aclimatación de los estomas en plantas regadas está en concordancia con resultados previos en los que obtuvimos una relación *C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>* constante tras el enriquecimiento en CO<sub>2</sub>.

Tanto si la aclimatación estomática es independiente del elevado CO<sub>2</sub> como si es una consecuencia de la aclimatación fotosintética del mesófilo, son cuestiones que aún no se han confirmado. El hecho de que la relación entre el CO<sub>2</sub> intercelular y el que rodea a la hoja permanezca constante cuando la concentración de CO<sub>2</sub> de crecimiento varía, es indicativo de un acoplamiento entre la *A* y la *g<sub>s</sub>* (Tabla 4.1 y 4.4). Sin embargo,

nuestros resultados, sobre la relación entre  $A$  y  $g_s$  en plantas de sequía, no parecen indicar que la aclimatación estomática se deba al grado de aclimatación fotosintética.

La respuesta aclimatoria al elevado  $\text{CO}_2$  de  $g_s$  y  $A$  es más pronunciada en plantas con deficiencia en N (Stitt y Krapp, 1999; Lodge et al., 2001; Del Pozo et al., 2005, 2007a), aún así, la regulación a la baja de la fotosíntesis también ha sido atribuida a cambios en la captación de los fotones (Urban et al., 2003). Las bajas tasas de captación de fotones detectadas podrían estar de acuerdo con un descenso en el contenido de clorofilas y carotenoides como ha sido observado en cebada por Sicher y Bunce (1997). Del Pozo et al. (2007b) observaron una correlación significativa entre el descenso en el contenido de clorofilas, el déficit en nitrógeno y el aumento de aclimatación al  $\text{CO}_2$  en plantas de trigo. Sin embargo, tampoco observamos cambios significativos en los niveles de pigmentos en plantas regadas (Tabla 4.8).

### 4.3.3. Curvas $A/C_i$

De acuerdo a la teoría, existen tres procesos bioquímicos que pueden imponer una limitación en la tasa de fijación de carbono *in vivo*. La inhibición de la  $A$  medida a bajas  $[\text{CO}_2]$  internas indica una limitación de la actividad Rubisco. La inhibición de la  $A$  por encima de la  $[\text{CO}_2]$  ambiental sugiere que la tasa de fijación de  $\text{CO}_2$  está limitada por la tasa de regeneración de la RuBP. La limitación de síntesis de carbohidratos (TPU) ocurre cuando la tasa de síntesis de almidón y sacarosa es baja y la disponibilidad de  $P_i$  es insuficiente para realizar la fotofosforilación (Sharkey, 1985; Smith et al., 1990).

Al analizar las curvas de respuesta al  $\text{CO}_2$  eliminamos el efecto del descenso de la  $g_s$ , inducido bien como respuesta a la elevada  $[\text{CO}_2]$  de crecimiento o bien como resultado de la sequía (Fig. 4.8). De esta manera fuimos capaces de deducir la importancia relativa de las limitaciones estomáticas y metabólicas de la fotosíntesis en ambas concentraciones de  $\text{CO}_2$ , así como la respuesta de los parámetros bioquímicos fotosintéticos al  $\text{CO}_2$  y a la disponibilidad hídrica (Tabla 4.5). En las curvas observamos que la asimilación se vio prácticamente saturada a  $C_i \geq 600 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  tanto en plantas de  $[\text{CO}_2]$  ambiental como en las de elevada  $[\text{CO}_2]$ , lo cual está relacionado con la inhibición impuesta por la regeneración de la RuBP (Lawlor 2002). Esta regeneración de la RuBP está mucho más limitada por el estrés hídrico y, por tanto, la  $A_{\text{max},C_i}$

disminuye progresivamente a medida que el estrés aumenta. La actividad *in vivo* de la Rubisco ( $V_{cmax}$ ) y la capacidad regenerativa de la RuBP ( $J_{max}$ ) se vieron incrementadas a elevada  $[CO_2]$ . Por lo tanto, esta mayor capacidad de fijar carbono en plantas a elevada  $[CO_2]$  en parte está relacionada con una reducción de fotorrespiración, lo que se traduciría en una  $A_{max}$  superior, pero también con un aumento de la actividad Rubisco, como se deduce del aumento en la eficiencia de carboxilación,  $CE$ , calculada a partir de las curvas *in vivo*  $A/C_i$  (von Caemmerer y Farquhar, 1981; Habash et al., 1995). Este aumento de la capacidad fotosintética en condiciones de elevado  $CO_2$  también es consecuencia del aumento del transporte electrónico,  $J_{max}$  (Tabla 4.5), especialmente en condiciones de elevada intensidad lumínica (Fig. 4.8).

En nuestro estudio observamos un marcado descenso de las tasas de asimilación en cualquiera de las  $C_i$  cuando se impuso el estrés hídrico bajo ambas  $[CO_2]$  (Fig. 4.8 y Tabla 4.5). Tanto  $A_{max}, C_i$  como la  $CE$  disminuyeron significativamente con el descenso del  $\Psi_w$ , como también observaron Tezara et al. (2002), Sharkey y Badger (1982), von Caemmerer y Farquhar (1984), Kellomaki y Wang (1996) y Lopes et al. (2004). Los reducidos valores de  $J_{max}$  y  $V_{cmax}$  podrían indicar una disminución de la tasa de regeneración de la RuBP y de la actividad Rubisco, respectivamente, como también ha sido sugerido por Cornic y Fresneau (2002), Lopes et al. (2004) y Centritto (2005). Se ha observado un mayor efecto del estrés hídrico sobre  $J_{max}$  que sobre  $V_{cmax}$ , lo cual indica que la regeneración de la RuBP se vio más afectada por la sequía que la actividad carboxilasa de la Rubisco en ambas condiciones de  $CO_2$ . Por otro lado, se ha sugerido que, en algunos casos, la fotosíntesis está regulada a la baja en plantas creciendo a elevada  $[CO_2]$  como consecuencia de una baja tasa de translocación de fotosintatos desde las fuentes a los sumideros (TPU). Sin embargo, nosotros encontramos un aumento de la TPU en plantas a elevada  $[CO_2]$ . Cuando las plantas estuvieron sometidas a sequía, la translocación de fotosintatos fue muy reducida bajo ambas  $[CO_2]$ , indicando que la sequía afectó a la traslocación del carbono asimilado.

La respiración,  $R_l$ , muestra una tendencia a aumentar como consecuencia del aumento del  $CO_2$ , pero las diferencias proporcionadas son solamente significativas en unos pocos experimentos (Ulman et al., 2000). Nuestros hallazgos mostraron que no hubo diferencias en la  $R_l$  por la  $[CO_2]$  cuando las plantas crecían con buena disponibilidad hídrica (Tabla 4.5). Por el contrario, a medida que el suelo se fue secando, la respiración aumentó bajo ambas  $[CO_2]$ . La mayor  $R_l$  se observó tras 16 días de sequía bajo  $[CO_2]$  ambiental, un 21% superior que bajo elevada  $[CO_2]$ . Este

incremento de la respiración podría estar relacionado con un aumento del consumo mitocondrial de las reservas de hidratos de carbono en condiciones de estrés hídrico, ya que la menor disponibilidad hídrica disminuye la fijación de carbono y la planta tiene que movilizar reservas. Puesto que la  $R_l$  es la liberación de  $\text{CO}_2$  respiratorio, al verse aumentada, provoca que el punto de compensación del  $\text{CO}_2$ ,  $\Gamma_{\text{CO}_2}$ , también aumentara con la sequía. La elevada  $[\text{CO}_2]$  provoca un aumento de la fotosíntesis neta para una misma  $C_i$  cuando comparamos las curvas de respuesta al  $\text{CO}_2$  de plantas creciendo a elevada  $[\text{CO}_2]$  o  $[\text{CO}_2]$  ambiental (Fig. 4.8). Por la propia definición del punto de compensación del  $\text{CO}_2$ , éste está directamente relacionado con la fotorrespiración en general o pérdida de  $\text{CO}_2$ . Por tanto, como vemos en nuestros resultados, fotorrespiración ( $J_o$ ), disminuye en plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$  comparado con las de  $[\text{CO}_2]$  ambiental, mientras que la  $R_l$  apenas varía, lo que hace que el punto de compensación de  $\text{CO}_2$  sea menor en plantas de elevada  $[\text{CO}_2]$ . En cambio tanto el punto de compensación del  $\text{CO}_2$  como la respiración aumentan a medida que la sequía se hace más severa, ya que sucede un aumento del consumo mitocondrial de azúcares bajo estas condiciones de estrés.

Las limitaciones estomática ( $L_s$ ) y no estomática ( $L_m$ ) de la  $A$  fueron influenciadas tanto por la  $[\text{CO}_2]$  como por el déficit hídrico. Las plantas creciendo a  $[\text{CO}_2]$  ambiental, a pesar de presentar una mayor  $g_s$ , mostraron una mayor  $L_s$  al  $\text{CO}_2$  que las plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$ , sugiriendo que, aunque el crecimiento a elevada  $[\text{CO}_2]$  induce cierre estomático, la mayor concentración externa de  $\text{CO}_2$  y la estimulación de la fotosíntesis compensan la limitación difusional impuesta por los estomas (Tissue et al., 1995; Drake et al., 1997; Maherali et al., 2002). Se ha sugerido que el descenso de la  $A$  en condiciones de estrés hídrico es una gran consecuencia de la limitación estomática, pero de acuerdo al modelo de Farquhar y Sharkey (1982), la  $L_s$  oscila en un rango del 20 al 50% (Escalona et al., 1999). En nuestro caso, la contribución de la  $L_s$  a la inhibición de la fotosíntesis, en condiciones de sequía, fue de un 40-47% en plantas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental y alrededor de un 16-19% en plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$ . Tanto en condiciones de riego como de sequía la  $L_s$  en condiciones de elevada  $[\text{CO}_2]$  fue menor que a  $[\text{CO}_2]$  ambiental. A pesar de la alta correlación entre la fotosíntesis y la conductancia estomática, el impacto de la limitación mesofilica sobre la fotosíntesis podría haber sido mayor. La  $L_m$  aumentó sustancialmente con la sequía y fue significativamente menor en plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$  (38%) que en plantas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental (71%). La inhibición de la carboxilación y el descenso en la translocación de



fotosintatos (TPU) podrían incrementar la limitación no estomática de la fotosíntesis. A este respecto, la  $L_m$  en condiciones de estrés hídrico ha sido atribuida a la reducción de la eficiencia de carboxilación de RuBP, la regeneración de la RuBP como hemos observado nosotros, o a la reducción en la cantidad de Rubisco (Tezara y Lawlor, 1995). La  $L_m$  de la fotosíntesis también pudo ser confirmada por los cambios detectados en la actividad fotoquímica foliar (Tablas 4.6 y 4.7).

Recientemente, se ha investigado sobre la importancia relativa de la reducción de la  $A$  relacionada con la resistencia del mesófilo. Loreto et al. (1992) demostraron que la conductancia del mesófilo era finita y que tenía un papel importante en condiciones severas de estreses abióticos como el hídrico y el salino. En estos casos, la  $C_i$  no es equivalente a la concentración de  $\text{CO}_2$  intracloroplástica,  $C_c$  (Bernacchi et al., 2002; Flexas et al., 2002). Autores como Bongi y Loreto (1989), Cornic et al. (1989) y Di Marco et al. (1990) observaron que los valores de  $C_c$  son menores que los de  $C_i$  y que estas diferencias aumentan bajo condiciones de estrés hídrico o salinidad. El descenso de  $C_c$  inducido por sequía fue demostrado, independientemente, con técnicas de discriminación de oxígeno radiactivo y fluorescencia (Renou et al., 1990; Tourneaux y Peltier, 1995; Sánchez-Rodríguez et al., 1999). Esta conductancia finita provocaría una reducción del  $\text{CO}_2$  disponible para la Rubisco e introduciría otra posible limitación de difusión al  $\text{CO}_2$  junto con la ya conocida  $g_s$ , denominada  $g_m$ . Jones (1973) sugirió que, por tanto, la  $g_m$  descendería en condiciones de sequía y hoy en día ya se conoce que la  $g_m$  varía según los estreses ambientales (Flexas et al., 2008 y citas incluidas). Aún así, aunque las respuestas de la  $g_m$  a la salinidad, sombreado, bajo nitrógeno y estrés hídrico están bastante generalizadas, son necesarios más estudios sobre la respuesta de la  $g_m$  al  $\text{CO}_2$ , al ozono y a la temperatura. También se ha estudiado la posible aclimatación de la  $g_m$  al aumento de  $\text{CO}_2$  y se ha visto que ocurre con menos frecuencia aunque en algunas especies y/o cultivares sí hubo aclimatación de la  $g_m$  (Singsaas et al., 2003; Flowers et al., 2007). Así, cuando se realizaron las curvas de respuesta  $A/C_c$  de plantas control y sometidas a estrés, las limitaciones estomáticas y del mesófilo solían explicar efectos erróneamente atribuidos a la limitación bioquímica, sobre todo a nivel de carboxilación (Centritto et al., 2003; Flexas et al., 2004). Por tanto, los datos obtenidos a partir de las curvas  $A/C_i$  deben tomarse con precaución hasta comprobar los valores de la  $g_m$  ya que se podría estar obteniendo una sobreestimación de la velocidad máxima de carboxilación ( $V_{cmax}$ ) y, en menor medida, también la sobreestimación de



la capacidad máxima de transporte de electrones ( $J_{max}$ ) en condiciones de estrés hídrico severo (Flexas et al., 2007).

Bajo condiciones de disponibilidad hídrica limitada, el cierre estomático reduce la disponibilidad de  $\text{CO}_2$  en el mesófilo del cloroplasto, lo que conlleva una disminución de la fotosíntesis especialmente al mediodía (Tehunen et al., 1987). Bajo estrés moderado, el cierre estomático se considera el principal factor limitante de la fotosíntesis mientras que al incrementarse la sequía aparecen limitantes no estomáticos (Flexas et al., 2002; Lawlor y Cornic, 2002; Peña-Rojas et al., 2004).

#### 4.3.4. Curvas $A/PPDF$

En nuestro estudio, la asimilación neta en función de la luz incidente (Fig. 4.9) aumentó en plantas bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  comparando con las plantas de  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Numerosos experimentos llevados a cabo con plantas C3 y atmósferas enriquecidas en  $\text{CO}_2$  mostraron una estimulación de la fotosíntesis en condiciones de luz saturante (Jones et al., 1985; Reddy et al., 1989, 1995; Druta, 2001; Fleisher et al., 2008). Una mayor eficiencia fotoquímica obtenida en plantas bajo elevada  $[\text{CO}_2]$ , tanto en sequía como en riego, parecía estar en consonancia con un aumento del transporte lineal de electrones y una mayor eficiencia metabólica en la utilización del ATP y del NADPH (Tablas 4.5 y 4.6).

La fuerte reducción de la fotosíntesis en las plantas de sequía observada en las curvas de respuesta a diferentes intensidades de luz (Fig. 4.9) podría deberse no sólo al cierre estomático, sino también al daño metabólico que se dedujo del descenso en la eficiencia fotoquímica. Además, las plantas creciendo a elevada  $[\text{CO}_2]$  mostraron una capacidad de regeneración de la RuBP (Tabla 4.5) mayor, así como un incremento de actividad potencial Rubisco, confirmada por una mayor eficiencia de carboxilación curvas  $A/C_i$  (Fig. 4.8 y Tabla 4.5). Por otro lado, las plantas creciendo bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  presentan mayor rendimiento cuántico para eficiencias fotoquímicas similares ( $\Phi_{\text{CO}_2}/\Phi_{\text{PSII}}$ ) (Fig. 4.10). Estos hallazgos nos muestran los mecanismos fisiológicos y bioquímicos mediante los cuales el elevado  $\text{CO}_2$  pospone el riesgo de dañar el aparato fotoquímico, permitiendo que las plantas resistan mejor el déficit hídrico edáfico. Como consecuencia de esto y de que nuestras plantas no presentaron aclimatación fotosintética durante las cinco semanas de experimento a elevada  $[\text{CO}_2]$  (Tabla 4.4), realmente

parece que las plantas de cebada podrían aumentar su productividad a medida que se incrementara la concentración atmosférica de dióxido de carbono y más cuanto mayor sea la intensidad de luz, especialmente en condiciones de disponibilidad hídrica restrictivas.

#### 4.3.5. Fluorescencia y pigmentos

La menor disponibilidad de agua provoca en los cultivos un descenso en el contenido hídrico en hojas lo que induce, primeramente, cierre estomático, imponiendo una restricción a la entrada de CO<sub>2</sub> en las células del mesófilo y, por consiguiente, produciendo un descenso en la tasa de asimilación fotosintética en la hoja (Williams et al., 1999; Lawlor y Cornic, 2002). Esta situación podría aumentar la sensibilidad del aparato fotosintético a la fotoinhibición puesto que la absorción de luz puede exceder a la utilizada por la fotosíntesis (Methy et al., 1996; Flexas et al., 1998; Escalona et al., 1999). Se ha observado que cuando el estrés hídrico aumenta, los parámetros de fluorescencia se ven modificados (Mena-Petite et al., 2005). Según varios autores, estos efectos estomáticos sobre la fotosíntesis no parecen perturbar los procesos de eficiencia fotoquímica del PSII o modificar otros parámetros asociados a la fluorescencia como la relación  $F_v/F_m$ , tal y como se ha demostrado en diversas especies (Massacci y Jones, 1990; Ögren, 1990; Castonguay y Markhart III, 1991; Jeffries, 1994; Marler y Mickelbart, 1998; Blaikie y Chaco, 1998; Lima et al., 2002; Nogués y Alegre, 2002).

En nuestro estudio  $F_v/F_m$  fue ligeramente reducido por el estrés hídrico (Tabla 4.7), lo que nos inducía a pensar que la sequía causó algún daño. Sin embargo, este daño sobre la estructura o funcionalidad del aparato fotosintético ( $F_v/F_m$ ) tan sólo fue del 10-16% después de 13-16 días en sequía bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental y del 9% tras 16 días de sequía bajo elevada [CO<sub>2</sub>] y, por tanto, cuando las plantas crecían a elevada [CO<sub>2</sub>] este efecto fue retrasado. Lawlor y Cornic (2002) y Centritto (2005) también vieron que  $F_v/F_m$  descendía solamente cuando el estrés hídrico era severo, sugiriendo que la actividad del PSII era resistente al déficit hídrico (Tezara et al., 2008). Además, dicho efecto negativo del estrés hídrico en el  $F_v/F_m$  fue reversible como se observó tras el riego (Tabla 4.7). La eficiencia del PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) también fue reducida por la sequía (Tabla 4.7). Cuando correlacionamos la atenuación fotoquímica ( $qP$ ) con el  $\Psi_w$  observamos una correlación lineal puesto que a medida que el  $\Psi_w$  fue haciéndose más

negativo el  $qP$  descendía (Tabla 4.7). En la literatura aparecen resultados contradictorios en relación al efecto del estrés hídrico sobre el  $qP$ , ya que han sido descritos desde descensos (Havaux et al., 1988; Loreto et al., 1995; Marques da Silva y Arrabaca, 2004) hasta no efectos (Flagella et al., 1994; Lu y Zhang, 1999). La reducción en el  $qP$  y la  $\Phi_{PSII}$  con la leve variación de  $F_v/F_m$  podrían estar asociados con una aclimatación del PSII durante el estrés hídrico, representando así un mecanismo de fotoprotección para igualar la tasa fotoquímica con el consumo de ATP y NADPH.

A pesar de que la  $[CO_2]$  no afectó significativamente a ninguno de los parámetros de fluorescencia analizados (Tabla 4.7),  $F_v/F_m$  en plantas bajo  $[CO_2]$  ambiental y estrés hídrico presentó una reducción mayor que bajo elevada  $[CO_2]$  en sequía y esto pudo ser debido a un procesamiento más eficiente del ATP y del NADPH, pero también a una mejor transducción de la energía en los tilacoides en condiciones de elevada  $[CO_2]$ , mientras que la eficiencia en la captura de energía de excitación en los centros de reacción abiertos del PSII ( $F'_v/F'_m$ ) apenas varió y el quenching fotoquímico descendió bajo ambas  $[CO_2]$  (39% y 20% para  $[CO_2]$  ambiental y elevada  $[CO_2]$ , respectivamente), descenso éste proporcional al presentado por la eficiencia fotoquímica del PSII (36% y 25% para  $[CO_2]$  ambiental y elevada  $[CO_2]$ , respectivamente). Por otro lado, en condiciones de riego y elevada  $[CO_2]$  se obtuvo un 10% más de  $\Phi_{PSII}$  que en plantas regadas bajo  $[CO_2]$  ambiental. Este resultado está en concordancia con los obtenidos por Long y Drake (1991), Habash et al. (1995) y Cousins et al. (2004) quienes también observaron un aumento en la  $\Phi_{PSII}$  a elevada  $[CO_2]$ . Por otro lado, algunos autores como Keutgen y Chen (2001) no obtuvieron efecto del elevado  $CO_2$  en la mayoría de parámetros de fluorescencia analizados y otros autores como Gutiérrez et al. (2009) vieron diferente respuesta a la  $[CO_2]$  (aumento o disminuciones) dependiendo del estadio de desarrollo en el que se encontraran las plantas objeto de estudio.

El hecho de que las tasas de fotosíntesis (Fig. 4.1B y D) se recuperaran hasta valores de asimilación similares a los de antes del inicio de la sequía indica que la limitación en la fijación de  $CO_2$  impuesta por las sequía no provoca un efecto permanente en el aparato fotosintético. La atenuación no fotoquímica ( $NPQ$ ) no fue significativamente afectada por la  $[CO_2]$  en plantas regadas, indicando que no hubo cambios en la disipación general por mecanismos no fotoquímicos. En condiciones de estrés hídrico, el  $NPQ$  aumentó a medida que el  $\Psi_w$  disminuía, contribuyendo a la disipación no fotoquímica (térmica) de la energía (Lawlor y Cornic, 2002) y

previniendo del daño a los tilacoides. No obstante, bajo  $[CO_2]$  ambiental y sequía el  $NPQ$  aumentó más que en plantas de sequía y elevada  $[CO_2]$ . El componente más significativo del  $NPQ$  es la disipación del exceso de energía “pH dependiente” ( $qE$ ) controlada por el gradiente de pH del tilacoide puesto que mientras el lumen se acidifica el estroma se alcaliniza, lo que se traduce en el  $\Delta pH$  transtilacoidal. Muller et al. (2001) sugirieron que el pH del lumen juega un papel adicional en la regulación del  $NPQ$  además de sobre el ciclo de las xantofilas. Es posible que las mayores tasas de  $A$  en condiciones de elevada  $[CO_2]$  amortigüen el  $\Delta pH$  lo suficiente como para reducir las tasas de  $NPQ$  pero de manera insuficiente para revertir el ciclo de las xantofilas en dirección a la violaxantina.

Aunque el déficit hídrico disminuyó la tasa máxima de transporte de electrones,  $ETR-Jt$ , como se esperaba del descenso en la  $A$  (Tezara et al., 2002), la proporción de electrones dirigidos hacia la oxigenación ( $Jo$ ) aumentó en respuesta a la sequía bajo ambas  $[CO_2]$  (Tabla 4.7). El mantenimiento del flujo de electrones hacia reacciones de oxigenación, como son la fotorrespiración y la reacción de Mehler, puede minimizar o prevenir al PSII del daño en condiciones de sequía y podría explicar la baja variación del  $Fv/Fm$  en las plantas adaptadas a la oscuridad, indicando que la sequía no provocó un daño permanente en el aparato fotosintético. Al igual que Hymus et al. (2001) pudimos observar que el elevado  $CO_2$  estimuló la tasa de transporte electrónico destinado a carboxilación ( $Jc$ ) en mayor proporción que la supresión de la tasa de transporte electrónico que va a la oxigenación ( $Jo$ ), aumentando la tasa de transporte de electrones total,  $ETR-Jt$ . Por tanto se vio modificado el balance entre carboxilación y fotorrespiración (2,23 en plantas de  $[CO_2]$  ambiental vs. 2,85 bajo elevada  $[CO_2]$ ) como resultado de los cambios cinéticos de la Rubisco ya que al aumentar el sustrato ( $[CO_2]$ ) aumenta la velocidad/tasa de formación del producto 3-fosfogliceraldehído (Habash et al., 1995). Este hecho podría explicar el menor efecto de la sequía sobre  $qP$ , con la menor reducción de los intermediarios fotoquímicos y la mitigación del efecto del estrés hídrico en la maquinaria fotosintética (fotoinhibición), como se deduce de mayores valores de  $Fv/Fm$  y  $\Phi PSII$  en plantas crecidas a elevada  $[CO_2]$ . Resultados similares observaron Zhang y Dang (2005), confirmando la teoría de que la estimulación de la fotosíntesis por parte del elevado  $CO_2$  ocurre a través de la promoción de la carboxilación primero de la Rubisco y de la disminución de la fotorrespiración (Lambers et al., 1998).

La asimilación fotosintética de CO<sub>2</sub> suele estar fuertemente inhibida durante el estrés hídrico inducido por la sequía (Boyer 1970a, b; Boyer y Bowen, 1970) porque la actividad de los enzimas del ciclo reductivo de las pentosas fosfato, como la Rubisco, está fuertemente inhibida en algunas especies a potenciales hídricos cercanos a -0,90 MPa (Hay y Walker, 1989). Sin embargo, la tasa de transporte electrónico es mucho más tolerante al estrés hídrico y, dependiendo de la especie vegetal, la tasa fotosintética de transporte de electrones en los cloroplastos foliares a altas intensidades de luz puede ser tan sólo un 20% menor que a intensidad normal a potenciales hídricos de -2,50 MPa (Boyer y Bowen, 1970; Hay y Walker, 1989). En nuestro estudio, la inhibición no estomática de la fotosíntesis es muy significativa en condiciones de sequía lo que corrobora que la fotosíntesis estuvo más determinada por la pérdida de actividad de los cloroplastos que por el incremento de la resistencia a la difusión de CO<sub>2</sub>. Sin embargo, cuando las plantas de sequía se rehidrataron, las variaciones reversibles detectadas en el transporte de electrones indicaron que la limitación no estomática descendió, ya que procesos tales como la respiración, fotorrespiración, etc., forman parte de los factores no estomáticos (Antolín, 1991).

En cuanto a los pigmentos, la sequía tuvo un efecto negativo sobre la concentración de clorofilas *a* y *b*. Una respuesta similar observó Antolín (1991) en plantas de alfalfa sometidas a estrés hídrico severo.

En condiciones de riego la [CO<sub>2</sub>] provocó un aumento del 23% y 16% en clorofila *a* y *b*, respectivamente, al final del estudio comparando con las plantas que crecieron bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental. Ingvarsdén y Veierskov (1994), trabajando también con cebada, Bunce y Sicher (2001) en soja, Fernández et al. (2002) en mandioca y Agüera et al. (2006) en pepino no observaron cambios significativos en el contenido de clorofila *a* y *b* bajo diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub>. Por el contrario, Sicher (1997, 1998, 1999) en estudios llevados a cabo en cebada y elevada [CO<sub>2</sub>] observó lesiones cloróticas causadas por un menor contenido en pigmentos y afirmó que la aparición de clorosis fue más evidente en plantas creciendo con un *PPDF* moderado-alto. Dado que él cultivó sus plantas con una mayor radiación (900 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) que nosotros (400 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), estas diferentes condiciones de crecimiento podrían explicar parcialmente que no encontramos clorosis en nuestras plantas bajo ambas [CO<sub>2</sub>]. Sin embargo, el elevado CO<sub>2</sub> causó una reducción del 15% en el contenido de carotenoides con respecto a las

plantas control bajo condiciones atmosféricas de CO<sub>2</sub>. Resultados similares obtuvieron [Agüera et al. \(2006\)](#) aunque la reducción resultó algo superior, alrededor del 25%.

La concentración de clorofila disminuyó con la sequía más a [CO<sub>2</sub>] ambiental (Chl *a* y *b*: 50%) que a elevada [CO<sub>2</sub>] (Chl *a*: 19% y Chl *b*: 30%). Esto sugiere que la elevada [CO<sub>2</sub>] protege a la planta del efecto de la sequía sobre los pigmentos. Similar argumentación fue sugerida por [Schwanz y Polle \(2001\)](#) al observar menores descensos de los pigmentos bajo condiciones combinadas de sequía y CO<sub>2</sub> en roble y pino. La clorofila *a* se encuentra tanto en los sistemas de captación de energía luminosa (antena) como en los centros de reacción, mientras que la clorofila *b* solo se encuentra en los sistemas antena. Según nuestros resultados, en general, se observó un descenso mayor de clorofila *b* que de clorofila *a*, bajo ambas concentraciones de CO<sub>2</sub>. Habida cuenta que la clorofila *b* se halla exclusivamente en las antenas, el mayor efecto de la sequía sobre esta clorofila sería indicativo de un efecto mayor del estrés hídrico sobre los sistemas captadores de luz que sobre los centros de reacción.

#### 4.4. Conclusiones

- La sequía produce una disminución de los procesos fotosintéticos estudiados. Por un lado, la asimilación de CO<sub>2</sub>, la conductancia estomática y la concentración interna de CO<sub>2</sub> presentaron menores tasas a causa del estrés hídrico. Por otro lado, todos los parámetros que se deducen de las curvas de luz y CO<sub>2</sub>, así como la fluorescencia también aparecen modificados por la restricción hídrica. La gran reducción causada en las tasas de fotosíntesis bajo el estrés hídrico se debe no solo a la limitación estomática sino también al deterioro metabólico que se deduce del descenso en la eficiencia fotoquímica.
- El efecto del elevado CO<sub>2</sub> sobre la *A*, *g<sub>s</sub>*, *E*, *C<sub>i</sub>*, *ITE*, *RQ*,  $\phi$ , y sobre la casi totalidad de los parámetros que se deducen del análisis de las curvas de luz y CO<sub>2</sub>, así como el contenido en pigmentos, fue significativo tanto en riego como en sequía. El transporte lineal de electrones se vio aumentado, mejorando así la utilización del ATP y NADPH. Además, las plantas crecidas con elevada [CO<sub>2</sub>] mostraron una mayor regeneración de RuBP así como un incremento de la actividad potencial de la Rubisco,

como se deduce de la eficiencia de carboxilación. Las plantas bajo elevada  $[CO_2]$  mostraron mayor rendimiento cuántico de la fotosíntesis para una eficiencia fotoquímica similar ( $\Phi CO_2/\Phi PSII$ ). En cambio, los parámetros de fluorescencia no se vieron afectados significativamente por la  $[CO_2]$  aunque fueron ligeramente mejorados.

- Las plantas sometidas a estrés hídrico y elevada  $[CO_2]$  mantienen mejores tasas fotosintéticas que las plantas en sequía y  $[CO_2]$  ambiental y por tanto también muestran mejores tasas de *ITE*. Este estado hídrico mejorado de las plantas de sequía y elevado  $CO_2$  podría ser el resultado de una regulación estomática más que de un ajuste osmótico.
- Por tanto, el elevado  $CO_2$  induce una menor  $g_s$  y una menor transpiración contribuyendo a mantener el  $\Psi_w$  y CHR. De este modo, aumentos en la  $[CO_2]$  actual, a pesar de la combinación con otros estreses abióticos como la sequía, pueden mitigar los efectos adversos de ésta sobre la fotosíntesis observados en las plantas creciendo a  $[CO_2]$  ambiental.
- Tras la recuperación hídrica también los parámetros fotosintéticos  $A$ ,  $g_s$ ,  $E$  y  $C_i$ , así como los pigmentos y la mayoría de parámetros de fluorescencia mostraron valores cercanos al control en riego mostrando que el daño producido por la sequía fue reversible.

# QUINTO CAPÍTULO

## METABOLISMO DEL NITRÓGENO\*

### 5.1. Introducción y objetivos

### 5.2. Resultados

#### 5.2.1. Actividad nitrato reductasa

#### 5.2.2. Actividad glutamina sintetasa

#### 5.2.3. Actividad glutamato deshidrogenasa

#### 5.2.4. Cuantificación de proteína soluble

### 5.3. Discusión

#### 5.3.1. Reducción de nitrato

#### 5.3.2. Asimilación de amonio

#### 5.3.3. Proteína soluble. Efecto de la sequía y de la [CO<sub>2</sub>]

### 5.4. Conclusiones

\*Datos parcialmente publicados en Robredo *et al.*, Environmental and Experimental Botany, 71: 399-408 (2011).



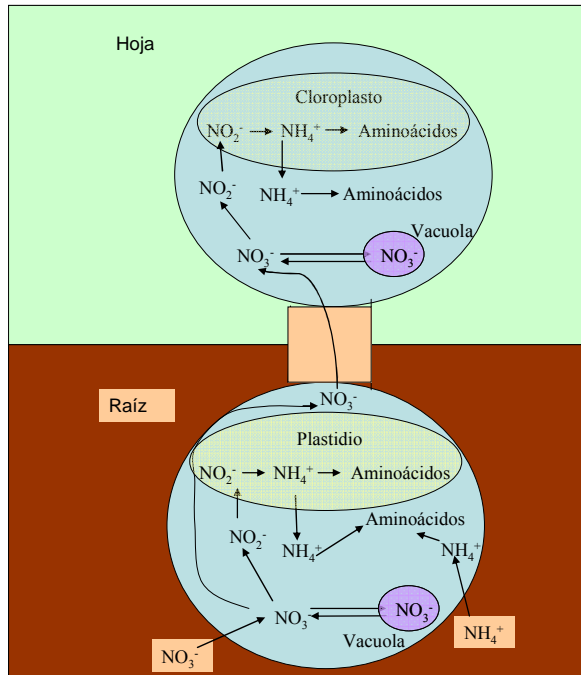


## 5.1. Introducción y objetivos

El nitrato es la forma predominante de nitrógeno disponible en el suelo para la mayoría de las especies cultivadas. La asimilación de nitrato por medio de la Nitrato Reductasa (NR, EC 1.5.6.1) puede considerarse la vía principal de incorporación del nitrógeno inorgánico en formas orgánicas útiles para el metabolismo vegetal (Stitt y Krapp, 1999) a pesar de que los costes energéticos de la utilización del nitrato (aproximadamente 2,4 g glucosa por g de proteína producida) son mayores que los de amonio (1,8 g de glucosa por g de proteína) (Zerihun et al., 1998). Dicha asimilación puede consumir más del 25% de la energía producida en la fotosíntesis (Solomonson y Barber, 1990).

La disponibilidad de N es un factor limitante para la producción en muchos de los ecosistemas terrestres y es un importante regulador en la respuesta de las plantas al elevado CO<sub>2</sub>. El estado del N en la planta depende tanto de la disponibilidad del N del suelo como de la capacidad de la planta para tomarlo y asimilarlo. Además la reducción de nitrato es un paso limitante en la asimilación del mismo (Natali et al., 2009). La reducción del nitrato es, además, un componente importante en la respuesta fisiológica de la planta al elevado CO<sub>2</sub> y al secuestro de carbono terrestre.

Aunque generalmente se asume que en plantas herbáceas la asimilación de nitrato ocurre principalmente en la hoja y en plantas leñosas en la raíz (Andrews, 1986; Andrews et al., 1992), dependiendo de la especie vegetal y de la concentración de nitrato en el medio, una determinada proporción del mismo se transporta a través del xilema hasta las hojas (Andrews, 1986) donde es reducido hasta amonio pudiendo después ser acumulado en las vacuolas o permanecer en el citosol (Fig. 5.1). La conversión de nitrato a amonio consta de dos etapas: primera, el nitrato es reducido a nitrito en el citosol vía Nitrato Reductasa y, segunda, el nitrito es reducido a amonio en los plastidios vía Nitrito Reductasa (NiR, EC 1.7.7.1). Posteriormente, la Glutamina Sintetasa (GS, EC 5.3.1.2) cataliza la incorporación de amonio al L-glutamato para formar L-glutamina con gasto de ATP. La glutamato sintasa ferredoxina-dependiente (fd-GOGAT, EC 1.4.7.1), en una transamidación reductiva transfiere el grupo amida de la glutamina al  $\alpha$ -cetoglutarato con gasto de poder reductor produciendo dos moléculas de glutamato. Uno de estos glutamatos será de nuevo sustrato de la GS, lo que permite el mantenimiento del ciclo, y el otro glutamato podrá utilizarse en otros procesos



**Fig. 5.1.** Esquema general de toma de nitrógeno en plantas no noduladas. Las raíces de las plantas pueden importar nitrato, amonio y otros compuestos nitrogenados desde el suelo. Para que pueda utilizarse en la síntesis de aminos y amidas, debe ser reducido a nitrito y luego a amonio. La reducción del nitrato en el citosol y el almacenamiento en la vacuola son procesos que pueden ocurrir tanto en hojas como en raíces (Buchanan et al., 2000).

requeridos por la célula. Se han descrito 2 isoformas de la GS presentes en hojas (McNally et al., 1983), que se conocen como GS1, localizada en el citosol (Mann et al., 1979; Wallsgrove et al., 1980) y GS2, localizada en los cloroplastos (O'Neal y Joy, 1973). Debido a que la isoforma GS1 aparece en una menor proporción en la mayoría de las especies vegetales y debido a que es insuficiente para reasimilar todo el amonio celular producido, el amonio debe entrar en el cloroplasto para que GS2 y fd-GOGAT lo asimilen. Para equilibrar el ciclo, la glutamina o el amonio y el  $\alpha$ -cetoglutarato deben entrar al cloroplasto a la misma velocidad que éste exporta glutamato al citosol (Yu y Woo, 1988). Tras la síntesis del glutamato, las aminotransferasas transfieren el grupo amino del glutamato al aspartato y a la alanina. El glutamato, el aspartato y, ocasionalmente, la glutamina se comportan como amino-donadores para la síntesis de otros aminoácidos, nucleótidos y compuestos celulares que contienen nitrógeno. Actualmente se considera que el ciclo GS/GOGAT es la vía principal de incorporación de amonio en compuestos orgánicos en condiciones fisiológicas (Mifflin y Lea, 1976; Wallsgrove et al., 1983; Lea et al., 1984). Este amonio puede proceder de fuentes externas tomándose directamente del medio, o de fuentes internas como producto del catabolismo de compuestos nitrogenados o de la fotorrespiración.

Al mismo tiempo, la concentración de amonio, glutamina o glutamato en hoja se ve afectada tanto por la tasa de reducción del nitrato (Deng et al., 1989) como por la tasa de fotorrespiración (Martin et al., 1983). La fotorrespiración representa la mayor fuente de amonio foliar de plantas C3. En ocasiones las tasas de fotorrespiración son muy altas, pudiendo alcanzar el flujo de amonio una producción 10 veces mayor que el

derivado de la asimilación inicial de nitrato llevada a cabo por el enzima NR (Keys et al., 1978; Givan et al., 1988; Migge et al., 1997).

El enzima Glutamato Deshidrogenasa (GDH, EC 1.4.1.3) también es capaz de incorporar el amonio al  $\alpha$ -cetoglutarato, con gasto de poder reductor, para formar glutamato, si bien su principal papel sería catalizar la reacción inversa en los procesos catabólicos. Durante mucho tiempo se consideró a la GDH como el enzima clave de la incorporación de amonio en aminoácidos debido a su ubicuidad en los organismos vivos y a su presencia en altas concentraciones en determinados tejidos (Loyola-Vargas y Sánchez-Jiménez, 1984; Srivastava y Singh, 1987). Sin embargo, su baja afinidad por el amonio ha sido un argumento empleado frecuentemente para cuestionar su papel aminante (Mifflin y Lea, 1976, 1980). De hecho, a la GDH se le asigna como función principal el catabolismo del glutamato (Mifflin y Lea, 1980; Stewart et al., 1980) presentando una participación menor en su síntesis (Wallsgrave et al., 1983, 1987). No obstante, también se le ha asignado un papel complementario de la ruta GS/GOGAT bajo determinadas circunstancias, tales como durante la senescencia (Laurière y Daussant, 1983), o bajo condiciones de estrés cuando los niveles de amonio pueden resultar tóxicos para las plantas, bien porque se produce un desacoplamiento de la fotofosforilación o porque se producen alteraciones en las membranas. En dichas circunstancias las plantas pueden utilizar la GDH como un mecanismo de desintoxicación (Wild et al., 1987). Asimismo, cuando la ruta GS/GOGAT está dañada (Srivastava y Singh, 1987) o inhibida por diferentes agentes químicos como el herbicida fosfinitricina (Lacuesta et al., 1990), la actividad aminante de la GDH incrementaría su importancia en la incorporación de amonio. Este enzima es preferentemente mitocondrial, dependiente de NADH, aunque también se ha localizado en el cloroplasto, dependiente de NADPH (Chou y Splittsoesser, 1972; Wallsgrave et al., 1979).

Como hemos señalado anteriormente, NR, GS y GDH son enzimas clave en el metabolismo del nitrógeno (Lam et al., 1996). Además, también están involucradas en la fotosíntesis y el metabolismo de carbohidratos (Evans 1983; Solomonson y Barber, 1990; Sibout y Guerrier, 1998; Llorens et al., 2003; Hirel et al., 2005). Así, una gran proporción del nitrógeno en la planta está localizado en las hojas a lo largo de todo su desarrollo, invirtiéndose gran parte en el aparato fotosintético (Makino y Osmond 1991).

La asimilación del nitrógeno está afectada por distintos factores ambientales entre los que cabe señalar la disponibilidad hídrica. Está ampliamente aceptado que la

sequía tiene un efecto negativo sobre la concentración de N (Sinclair et al., 2000) y sobre el contenido en aminoácidos y proteínas solubles. Además, se ha constatado que la sequía produce un descenso en la actividad NR como se ha observado en trigo (Xu y Yu, 2006; Kathju et al., 1990), patata (Ghosh et al., 2000) y maíz (Foyer et al., 1998), descenso que se correlaciona estrechamente con la caída en la asimilación de CO<sub>2</sub> lo que indica una estrecha co-regulación del metabolismo del carbono y del nitrógeno en plantas superiores.

Por otro lado, al estar interconectados los metabolismos del C y del N, ambos se regulan recíprocamente (Evans 1983; Llorens et al., 2003). La asimilación del nitrógeno en las plantas requiere poder reductor, ATP y esqueletos carbonados que en último término dependen de la fotosíntesis. Ésta a su vez depende de la disponibilidad de nutrientes, como el nitrógeno, y de sus tasas de toma y asimilación.

Bajo el creciente aumento de CO<sub>2</sub> atmosférico, se ha constatado que las tasas de fotosíntesis se ven incrementadas (ver Capítulo 4). Dicha respuesta, sin embargo, puede variar con la especie y el tipo de metabolismo. La incidencia del alto CO<sub>2</sub> sobre la asimilación del nitrato y del amonio presenta resultados contradictorios: se han obtenido ligeros incrementos de la actividad NR en especies como mostaza (Maevszkaya et al., 1990) o *Vigna radiata* (Sharma y Sen Gupta, 1990), y descensos en otras como trigo (Hocking y Meyer, 1991a, b) o maíz (Purvis et al., 1974).

Aunque existen varios estudios sobre la interacción del elevado CO<sub>2</sub> y la toma de nitrógeno, existen dos razones principales que hacen necesario un análisis detallado del metabolismo del nitrógeno para entender el mecanismo que rige la respuesta al elevado CO<sub>2</sub> cuando, además, dicho factor interacciona con la sequía. La primera, porque un incremento en la tasa de crecimiento bajo elevado CO<sub>2</sub> puede llevar a la planta a modificar su desarrollo y crecimiento, limitado por el nitrógeno, y algunos de los mecanismos metabólicos y fisiológicos podrían verse afectados de forma indirecta. La segunda hace referencia a la necesidad de identificar los cambios significativos en la regulación del metabolismo, el desarrollo y el crecimiento de plantas a elevada [CO<sub>2</sub>] para conocer la respuesta del metabolismo del N. Esta respuesta podría incluir factores que aumenten la toma y asimilación de nitrógeno, o la localización del nitrógeno en la célula y en la planta.

En resumen, por un lado, la sequía afecta al metabolismo del N a nivel de toma, reducción y asimilación mientras que, por otro lado, la incidencia del alto CO<sub>2</sub> sobre la asimilación del nitrato y del amonio presenta resultados contradictorios.

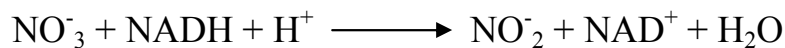
Los objetivos del presente capítulo han sido:

- Estudiar cómo afecta la sequía a los procesos de reducción de N y de incorporación de amonio.
- Analizar si el CO<sub>2</sub> modifica, potencia o amortigua el efecto negativo de la sequía en el metabolismo del N.
- Evaluar la capacidad de las plantas para recuperarse del estrés hídrico, bajo ambas condiciones de [CO<sub>2</sub>], ambiental y elevada.

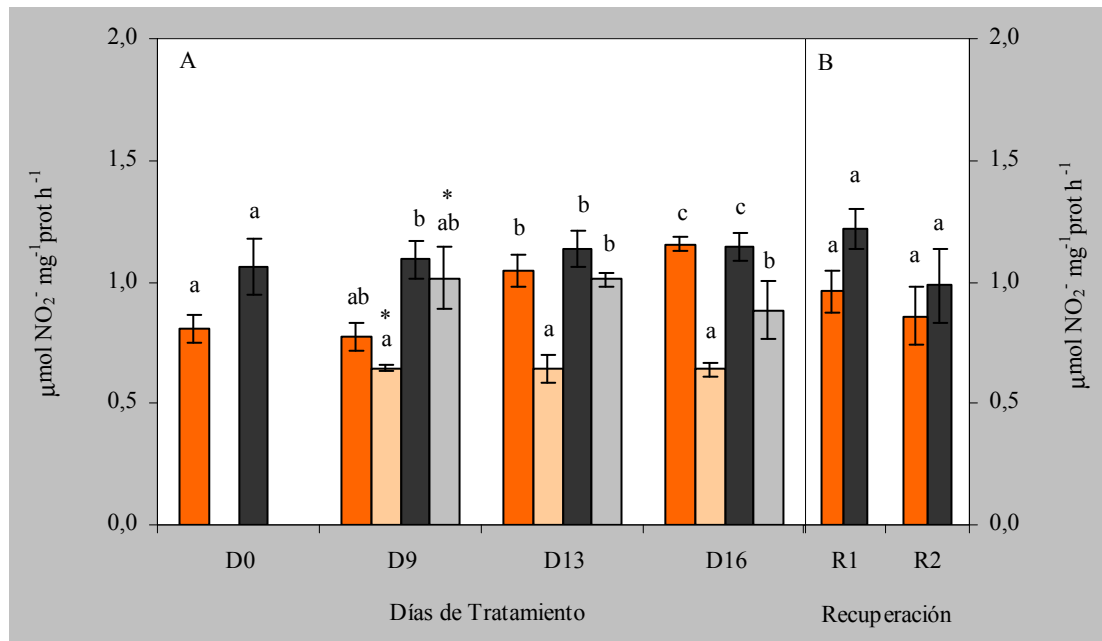
Por todo ello, para dilucidar qué ocurre cuando estas variables afectan a la cebada de forma individual o combinada, hemos determinado las actividades enzimáticas NR, GS y GDH, así como el contenido proteico soluble total en plantas de cebada sometidas a sequía y en atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub>.

## 5.2. Resultados

### 5.2.1. Actividad nitrato reductasa, NR



La actividad NR potencial máxima, medida con EDTA (Fig. 5.2) se vio afectada significativamente tanto por la sequía como por el CO<sub>2</sub> ( $P \leq 0,001$ ). Cuando las plantas crecieron con buena disponibilidad hídrica y elevada [CO<sub>2</sub>] presentaron un 30% más de actividad NR-EDTA al comienzo y tras 9 días de estudio (D0 y D9) que las plantas de [CO<sub>2</sub>] ambiental. A partir del día 13 (D13 y D16) estas diferencias disminuyeron. Cuando las plantas crecieron a [CO<sub>2</sub>] ambiental y además se sometieron a sequía se observaron descensos del 17%, 38% y 45% en los tratamientos de 9, 13 y 16 días de sequía, respectivamente. Por otro lado, también se observó un efecto negativo, aunque menor, de la sequía en las plantas crecidas a elevada [CO<sub>2</sub>] con descensos del 7%, 11% y 23% para los tratamientos D9, D13 y D16, respectivamente. El efecto del tiempo de exposición al tratamiento sobre la actividad NR-EDTA no fue significativo (Fig. 5.2), sin embargo, la interacción entre los factores edad y sequía resultó estadísticamente significativa ( $P \leq 0,05$ ) así como la interacción entre la sequía y la concentración de CO<sub>2</sub> ( $P \leq 0,05$ ).



| Parámetro | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|-----------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| NR-EDTA   | ***             | n.s.                | ***    | n.s.                                  | *                        | *                            | n.s.   |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento.

**Fig. 5.2.** Interacción a lo largo del tiempo entre la sequía y el elevado CO<sub>2</sub> sobre la actividad NR en presencia de EDTA. **A)** D0 representa las plantas bien regadas al inicio del estudio: [CO<sub>2</sub>] ambiental (barras naranjas) y [CO<sub>2</sub>] elevada (barras grises); D9, D13 y D16 representan los días 9, 13 y 16, respectivamente, donde se mantienen plantas regadas (barras oscuras) y en sequía (barras claras). **B)** R1 y R2 representan las recuperaciones hídricas de las sequías S9 y S13, respectivamente. Los valores son la media ± ES de tres experimentos independientes, repetido cada uno de ellos tres veces. Dentro del mismo día de medida, las diferentes letras representan diferencias significativas a un nivel de  $P \leq 0,05$ . Dentro del mismo día de medida y para igual tratamiento hídrico el \* indica diferencias significativas a  $P \leq 0,05$  entre los tratamientos de CO<sub>2</sub> y el mismo tratamiento hídrico.

Tras el restablecimiento del riego (Fig. 5.2B), se observó que las plantas sometidas a sequía durante 9 días y luego rehidratadas (R1) mostraron valores cercanos al control (83%) a [CO<sub>2</sub>] ambiental o ligeramente superiores a elevada [CO<sub>2</sub>]. La recuperación de S13 (R2) también fue considerable, de modo que los valores fueron un 75% y un 86% del valor control en [CO<sub>2</sub>] ambiental y elevada, respectivamente (Fig. 5.2B).

Cuando analizamos la actividad NR real, medida en presencia de Mg<sup>2+</sup> (Fig. 5.3), observamos que tanto la sequía como la [CO<sub>2</sub>] ejercen un efecto significativo sobre

la actividad ( $P \leq 0,001$ ). Las plantas que crecieron a elevada  $[\text{CO}_2]$  y riego mostraron valores de reducción de nitrato un 85%, 60%, 48% y 45% mayores que las que crecían a  $[\text{CO}_2]$  ambiental en los días 0, 9, 13 y 16, respectivamente (Fig. 5.3A). Por otro lado, cuando las plantas se sometían a sequía y elevada  $[\text{CO}_2]$  también presentaban mayores tasas de actividad NR-Mg<sup>2+</sup> que las que crecían a  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Los porcentajes de incremento fueron del 136%, 75% y 273%, para las sequías de 9, 13 y 16 días, respectivamente (Fig. 5.3).

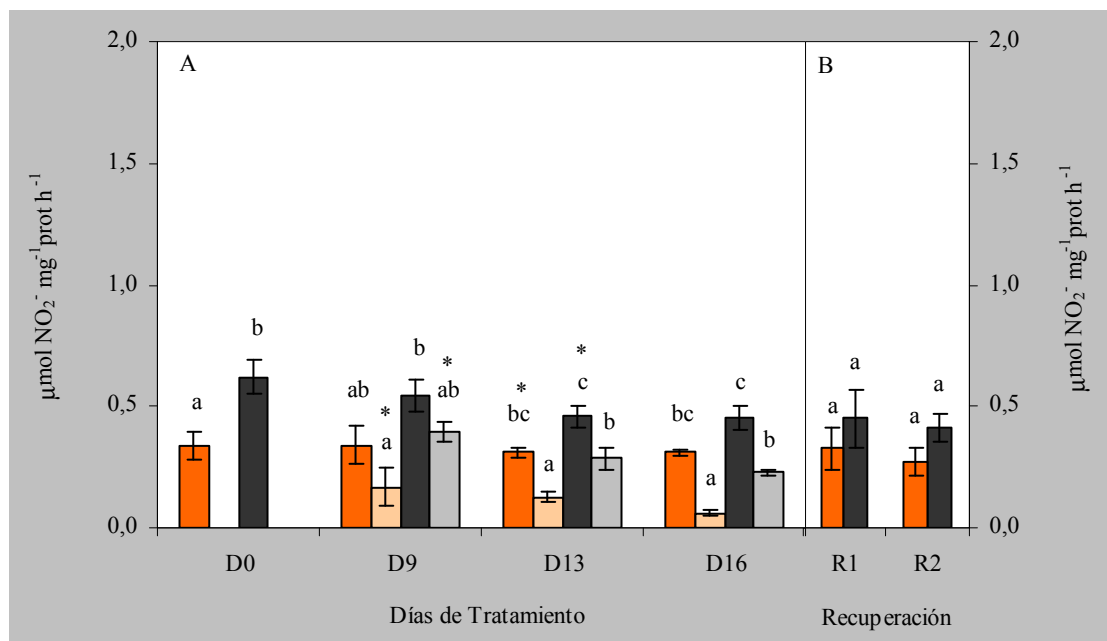
El efecto de la sequía a  $[\text{CO}_2]$  ambiental provocó descensos del 51%, 59% y 82% para las sequías de D9, D13 y D16, respectivamente. En condiciones de elevada  $[\text{CO}_2]$  la sequía produjo descensos del 27%, 38% y 49%, para las mismas sequías, respectivamente. Por tanto, el efecto de la sequía fue más acentuado a  $[\text{CO}_2]$  ambiental que a elevada (Fig. 5.3A).

A diferencia de la actividad NR-EDTA (Fig. 5.2), no se observaron interacciones significativas entre los factores analizados, aunque sí se obtuvo efecto significativo del tiempo de exposición al tratamiento ( $P \leq 0,05$ ) además del  $\text{CO}_2$  y de la sequía, sobre la actividad NR-Mg<sup>2+</sup> (Fig. 5.3).

El restablecimiento del riego (Fig. 5.3B) recuperó la actividad NR-Mg<sup>2+</sup> hasta alcanzar valores iguales al control tras 7 días de riego de las plantas R1 tanto a elevada  $[\text{CO}_2]$  como a  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Las plantas R2 alcanzaron el 88% y 91% de sus correspondientes controles bajo  $[\text{CO}_2]$  ambiental y elevada, respectivamente (Fig. 5.3B).

El estado de activación del enzima NR (Tabla 5.1) fue mayor en plantas regadas que en plantas sometidas a sequía. Además, la tendencia general fue a disminuir con la edad. Así, en el caso de las plantas regadas, desde el D0 al D16, el estado de activación disminuyó un 36% y un 33%, en  $[\text{CO}_2]$  ambiental y elevada, respectivamente (Tabla 5.1). Igualmente, en plantas sometidas a sequía, el estado de activación del enzima NR disminuyó un 77% y un 56%, en  $[\text{CO}_2]$  ambiental y elevada, respectivamente (Tabla 5.1).





| Parámetro           | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|---------------------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| NR-Mg <sup>2+</sup> | ***             | *                   | ***    | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento.

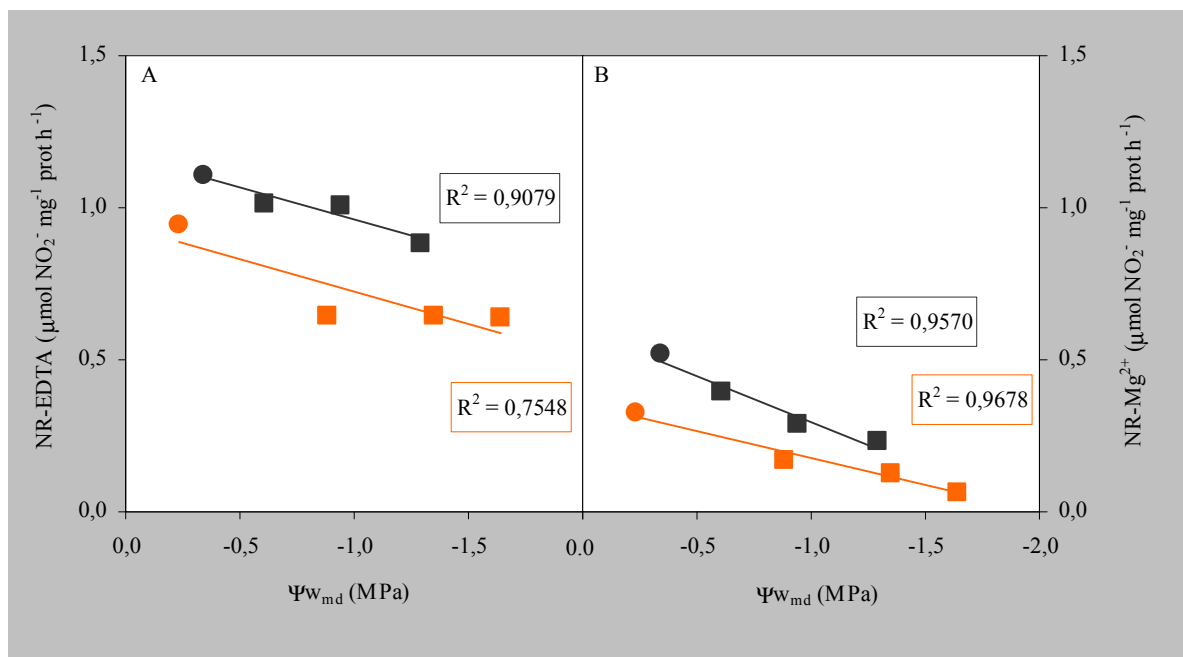
**Fig. 5.3.** Interacción a lo largo del tiempo entre la sequía y el elevado CO<sub>2</sub> sobre la actividad NR medida en presencia de Mg<sup>2+</sup>. Condiciones de crecimiento y análisis estadístico como en Fig. 5.2.

En las plantas sometidas a sequía se observó un marcado descenso a medida que ésta se hacía más severa. En condiciones de [CO<sub>2</sub>] ambiental (Tabla 5.1) y respecto a sus tratamientos de riego se obtuvieron descensos del 41%, 33% y 64% en las sequías de D9, D13 y D16, respectivamente. Por otro lado, a [CO<sub>2</sub>] elevada observamos descensos del 22%, 30% y 35% en las sequías de D9, D13 y D16, respectivamente.

**Tabla 5.1.** Estado de activación del enzima NR (%) en condiciones de riego (Control) y estrés hídrico (Sequía) bajo diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> a lo largo de 16 días.

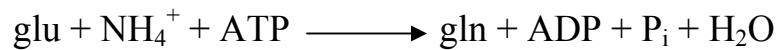
| Días | Control |        | Sequía |        |
|------|---------|--------|--------|--------|
|      | 350ppm  | 700ppm | 350ppm | 700ppm |
| 0    | 41,6    | 58,5   | 41,6   | 58,5   |
| 9    | 43,9    | 49,8   | 25,9   | 38,9   |
| 13   | 29,7    | 40,6   | 19,8   | 28,3   |
| 16   | 26,8    | 39,4   | 9,6    | 25,8   |

Cuando se comparó el efecto del  $\text{CO}_2$  sobre plantas que presentaban un potencial hídrico al mediodía similar, de  $-0,9\text{MPa}$  (Fig. 5.4), la actividad NR-EDTA fue un 56% superior a elevada  $[\text{CO}_2]$  que a ambiental (Fig. 5.4A). Transcurridos 3-4 días, el potencial hídrico disminuyó hasta  $-1,3\text{MPa}$  y observamos que la actividad NR-EDTA seguía siendo un 38% superior a elevada  $[\text{CO}_2]$  que a ambiental (Fig. 5.4A). Si analizamos la actividad NR- $\text{Mg}^{2+}$  (Fig. 5.4B), a igual  $\Psi_{\text{wmd}}$  se observaron mayores tasas de actividad a elevada  $[\text{CO}_2]$  que a ambiental. Esto es, para un  $\Psi_{\text{wmd}}$  de  $-0,9\text{MPa}$  la actividad NR- $\text{Mg}^{2+}$  era un 71% mayor a elevada  $[\text{CO}_2]$  que a  $[\text{CO}_2]$  ambiental y para un  $\Psi_{\text{wmd}}$  de  $-1,3\text{MPa}$  también se obtuvo un 79% más de actividad NR- $\text{Mg}^{2+}$  a elevada  $[\text{CO}_2]$  que a ambiental.

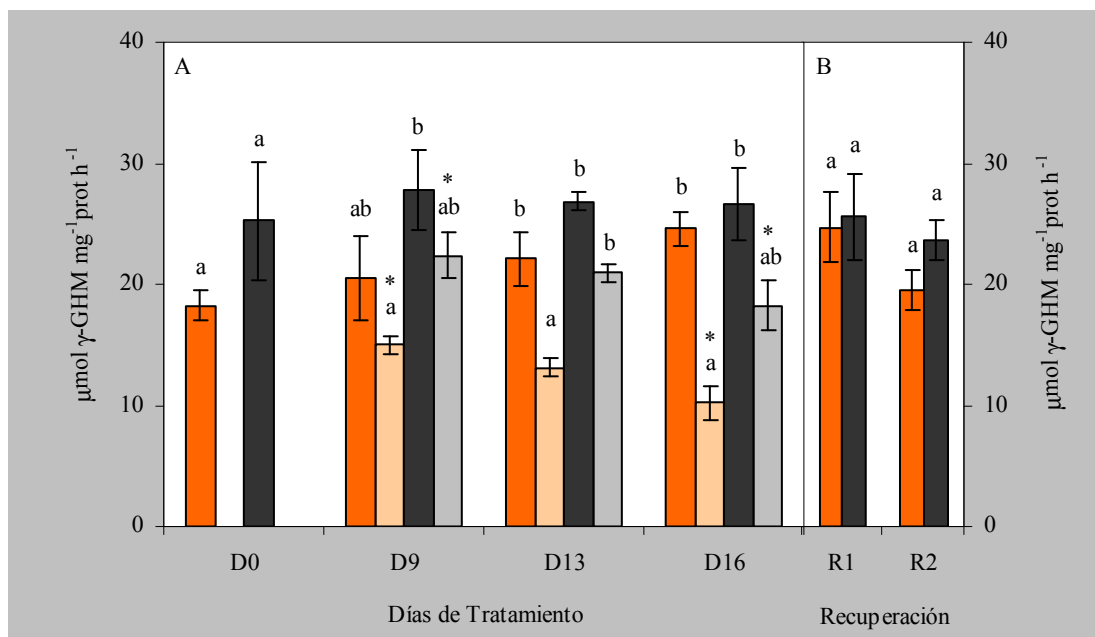


**Fig. 5.4.** A) Correlación entre la actividad NR-EDTA y el potencial hídrico al mediodía ( $\Psi_{\text{wmd}}$ ). B) Correlación entre la actividad NR- $\text{Mg}^{2+}$  y el potencial hídrico al mediodía ( $\Psi_{\text{wmd}}$ ). Los círculos se corresponden con plantas regadas (valor medio de los controles de todo el experimento) y los cuadrados representan plantas en sequía durante 9, 13 ó 16 días. Elevada  $[\text{CO}_2]$  en color gris y  $[\text{CO}_2]$  ambiental en color naranja. La línea de tendencia y el factor de correlación se corresponden con una función lineal.

### 5.2.2. Actividad glutamina sintetasa, GS



La actividad GS (Fig. 5.5) se vio influenciada significativamente por la disponibilidad hídrica ( $P \leq 0,001$ ) y por la  $[\text{CO}_2]$  ( $P \leq 0,001$ ). En plantas bien regadas y crecidas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental la actividad GS tendía a incrementarse con la edad de la planta, mientras que las plantas crecidas con ese mismo régimen hídrico pero a elevada  $[\text{CO}_2]$  presentaban un ligero incremento de la actividad GS hasta el día 9 de estudio, permaneciendo constante posteriormente. La actividad GS mostró un acentuado descenso por efecto de la sequía en ambos tratamientos de  $\text{CO}_2$  (Fig. 5.5A). En  $[\text{CO}_2]$  ambiental, la actividad GS disminuyó un 27%, 41% y 59% tras 9, 13 y 16 días de sequía, respectivamente (Fig. 5.5A). Por otro lado, bajo elevada concentración de  $\text{CO}_2$  los descensos fueron inferiores, siendo de un 19%, 22% y 31% para las sequías de 9, 13 y 16 días, respectivamente (Fig. 5.5A). La actividad GS fue superior en el tratamiento de elevado  $\text{CO}_2$ . En las plantas regadas (Fig. 5.5A), la actividad media de la GS, a lo largo de todo el estudio, fue un 25% superior a elevada  $[\text{CO}_2]$  que a  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Por otro lado, la actividad media GS de las plantas en sequía fue un 60% superior a elevada  $[\text{CO}_2]$  que a  $[\text{CO}_2]$  ambiental (Fig. 5.5A). En la sequía más prolongada (D16) se observó una actividad GS un 79% superior respecto a la de  $\text{CO}_2$  ambiental ( $18 \mu\text{mol } \gamma\text{-GHM mg}^{-1} \text{ prot h}^{-1}$  a elevada  $[\text{CO}_2]$  frente a  $10 \mu\text{mol } \gamma\text{-GHM mg}^{-1} \text{ prot h}^{-1}$  a  $[\text{CO}_2]$  ambiental) por lo que el efecto del  $\text{CO}_2$  sobre las plantas privadas de riego fue mayor cuanto más se prolongó la sequía (Fig. 5.5A).



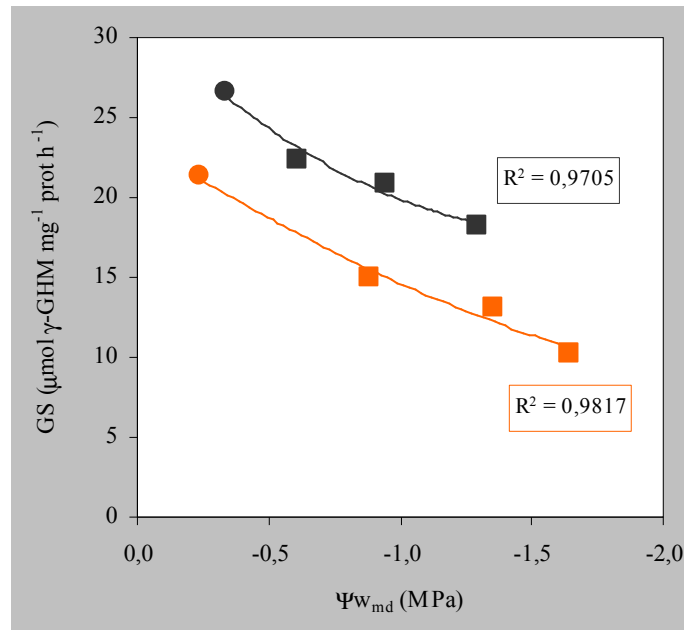
| Parámetro | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|-----------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| GS        | ***             | n.s.                | ***    | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento.

**Fig. 5.5.** Actividad GS a lo largo del tiempo bajo la interacción de la sequía y el elevado CO<sub>2</sub>. Condiciones de crecimiento y análisis estadístico como en Fig. 5.2.

En todos los casos, tras el restablecimiento del riego, el enzima GS recuperó su actividad hasta valores cercanos al control (Fig. 5.5B). Concretamente, a [CO<sub>2</sub>] ambiental la recuperación R1 fue total, alcanzando valores similares al control al final del estudio y la R2 alcanzó el 79% del mismo. Las recuperaciones a [CO<sub>2</sub>] elevada alcanzaron un 96% y un 89% de su control, para R1 y R2, respectivamente (Fig. 5.5B).

Cuando se analizó el efecto del CO<sub>2</sub> sobre las plantas que presentaban un estado hídrico similar (Fig. 5.6), se observó que para un  $\Psi_w$  de aproximadamente -0,9MPa la actividad GS a elevada [CO<sub>2</sub>] era un 39% superior que a [CO<sub>2</sub>] ambiental. A medida que disminuía el potencial hídrico (hasta -1,3MPa) observamos que la actividad GS permaneció un 40% superior a elevada [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental. Este resultado viene a respaldar el retraso temporal del efecto negativo de la sequía sobre las plantas de cebada cuando éstas crecen a una concentración de CO<sub>2</sub> atmosférica superior a la ambiental.



**Fig. 5.6.** Correlación entre la actividad GS y el potencial hídrico al mediodía ( $\Psi_{w_{md}}$ ). Los círculos se corresponden con plantas regadas (valor medio de los controles de todo el experimento) y los cuadrados representan plantas en sequía durante 9, 13 ó 16 días. Elevada  $[CO_2]$  en color gris y  $[CO_2]$  ambiental en color naranja. La línea de tendencia y el factor de correlación se corresponden con una función polinómica de grado 2.

### 5.2.3. Actividad glutamato deshidrogenasa, GDH

La actividad GDH se ensayó en los dos sentidos de la reacción, aminante (GDH-NADH) y desaminante (GDH-NAD<sup>+</sup>), mostrándose los resultados obtenidos en las figuras 5.7 y 5.8, respectivamente.

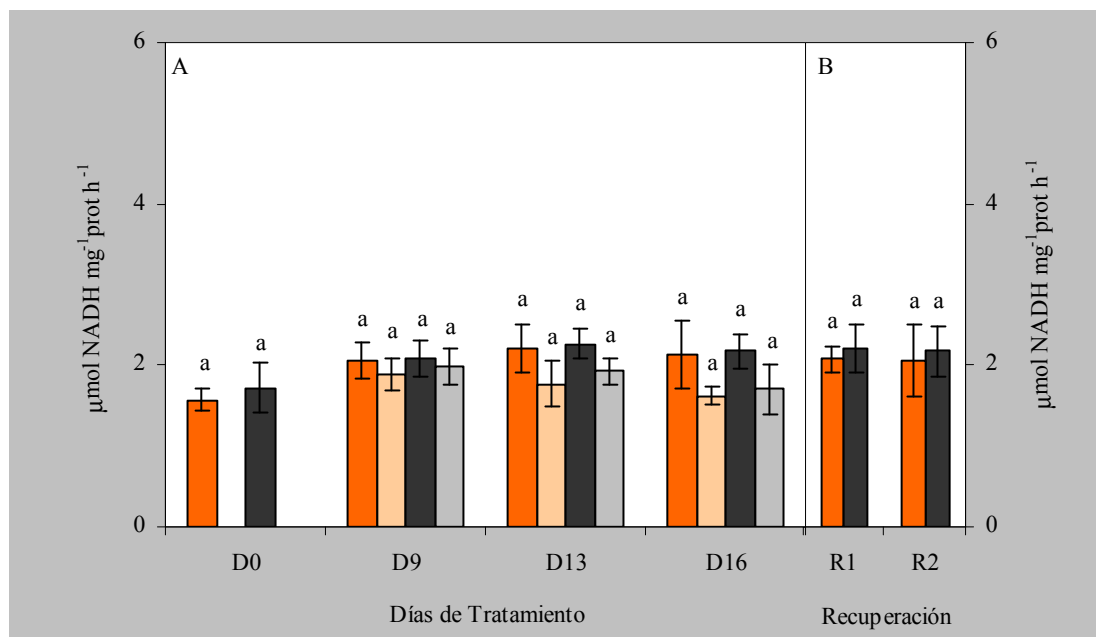
#### 5.2.3.1. Actividad aminante, GDH-NADH



La actividad GDH-NADH (Fig. 5.7) disminuyó moderadamente con la sequía ( $P \leq 0,05$ ). Tras 16 días de sequía, se observaron descensos del 22% y 24% a  $[CO_2]$  ambiental y elevada, respectivamente (Fig. 5.7A).

Al analizar la influencia de la  $[CO_2]$  no se observó efecto significativo (Fig. 5.7) sobre las plantas control ni tampoco sobre las plantas en sequía (Fig. 5.7A).

Cuando se comprobó cómo respondían las plantas de sequía al restablecimiento hídrico (Fig. 5.7B) se observó que se recuperaban hasta mostrar valores similares a sus controles a elevado  $CO_2$ , alcanzando el 96% de su valor control a la concentración de  $CO_2$  ambiental (Fig. 5.7B).

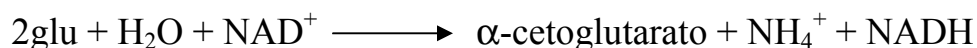


| Parámetro | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|-----------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| GDH-NADH  | n.s.            | n.s.                | *      | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento.

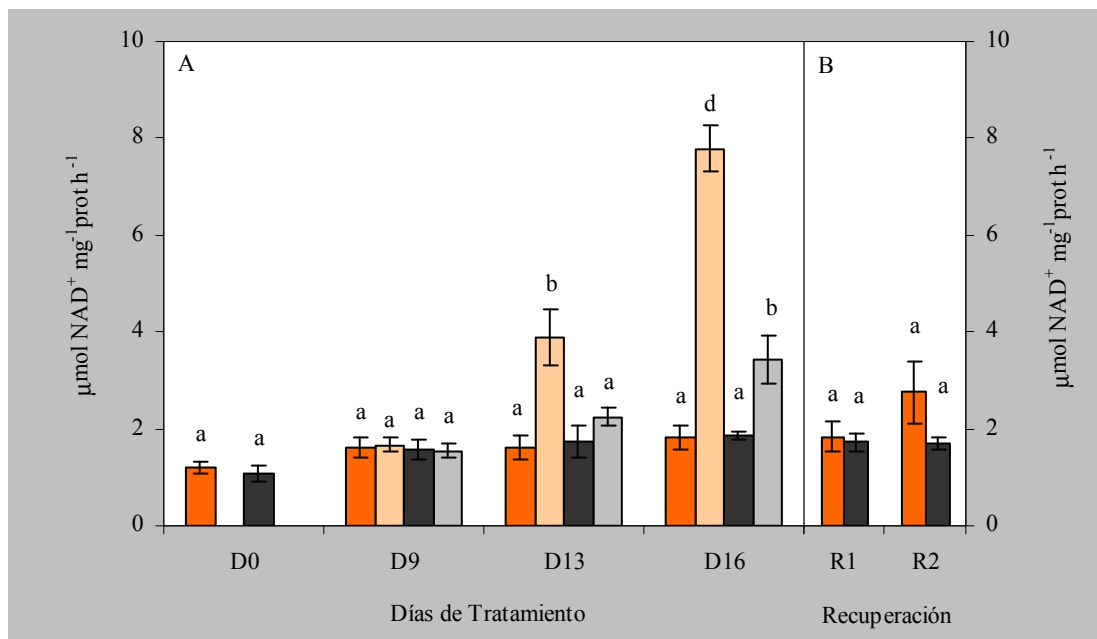
**Fig. 5.7.** Interacción a lo largo del tiempo entre la sequía y el elevado  $CO_2$  sobre la actividad GDH-NADH. Condiciones de crecimiento y análisis estadístico como en Fig. 5.2.

### 5.2.3.2. Actividad desaminante, GDH-NAD<sup>+</sup>



Se observó un efecto significativo tanto de la sequía, de la  $[CO_2]$  y del tiempo de exposición al tratamiento como de sus interacciones ( $P \leq 0,001$ ) sobre la actividad GDH-NAD<sup>+</sup> (Fig. 5.8). Cuando las plantas fueron sometidas a déficit hídrico (Fig.

5.8A) dicha actividad enzimática aumentó fundamentalmente a partir de 13 días de sequía. La respuesta no fue de la misma magnitud si las plantas crecían a elevada  $[\text{CO}_2]$  o a  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Así, a  $[\text{CO}_2]$  ambiental la actividad  $\text{GDH-NAD}^+$  aumentó un 143% y un 328% para los tratamientos D13 y D16, respectivamente. En cambio, cuando las plantas crecían a  $[\text{CO}_2]$  elevada se observaron aumentos del 18% y 84% en los tratamientos D13 y D16, respectivamente (Fig. 5.8A).



| Parámetro            | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|----------------------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| GDH-NAD <sup>+</sup> | ***             | ***                 | ***    | ***                                   | ***                      | ***                          | ***  |

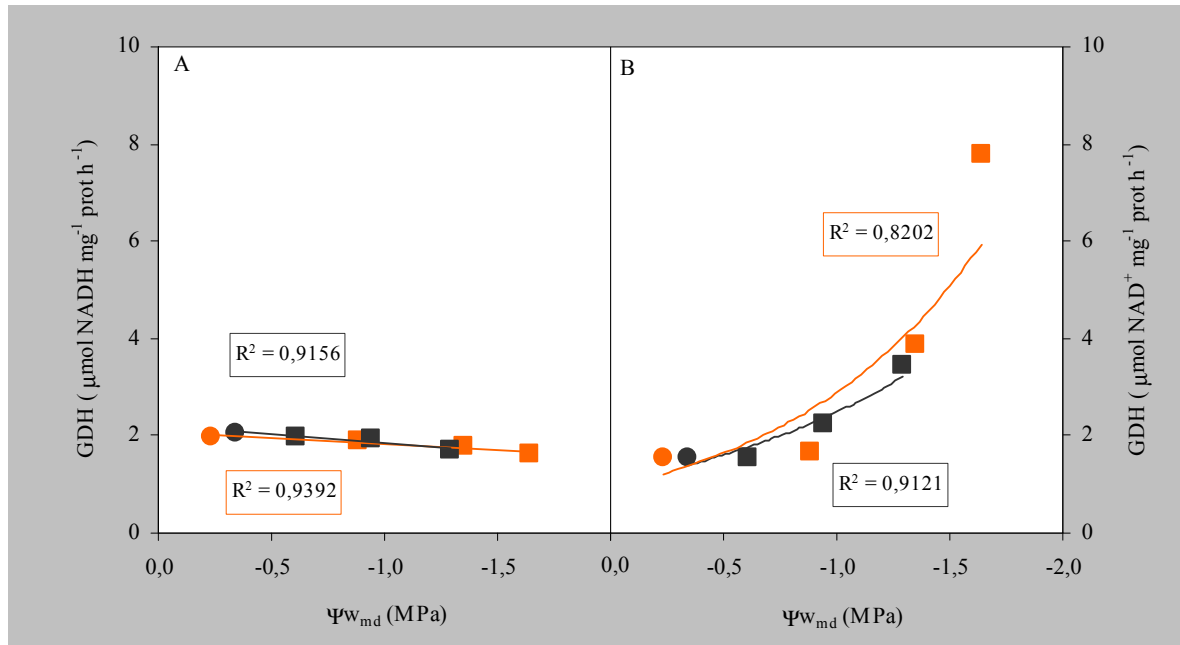
El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento.

**Fig. 5.8.** Interacción a lo largo del tiempo entre la sequía y el elevado  $\text{CO}_2$  sobre la actividad  $\text{GDH-NAD}^+$ . Condiciones de crecimiento y análisis estadístico como en Fig. 5.2.

Al restablecer el riego (Fig. 5.8B) se observó que a elevada  $[\text{CO}_2]$  R1 y R2 mostraron valores similares a los de plantas control. A  $[\text{CO}_2]$  ambiental R1 resultó similar al control mientras que R2, aunque disminuyó su actividad  $\text{GDH-NAD}^+$ , todavía representaba un 51% más que el valor control (Fig. 5.8B).

Al analizar el efecto del  $\text{CO}_2$  sobre las plantas que presentaban un mismo estado hídrico, independientemente de la edad, observamos que la actividad  $\text{GDH-NADH}$  (Fig. 5.9A) fue similar. Tanto para  $\Psi_{\text{wmd}}$  de  $-0,9\text{MPa}$  como de  $-1,3\text{MPa}$  obtuvimos tasas de actividad prácticamente iguales (Fig. 5.9A). Por el contrario, al analizar la actividad  $\text{GDH-NAD}^+$  (Fig. 5.9B), vimos que para un  $\Psi_{\text{wmd}}$  similar de  $-0,9\text{MPa}$  la actividad resultó un 13% inferior a  $[\text{CO}_2]$  ambiental y, en cambio, para un  $\Psi_{\text{wmd}}$  de  $-1,3\text{MPa}$  fue

un 12% inferior a  $[\text{CO}_2]$  elevada. Hay que recordar que el  $\Psi_{\text{w}_{\text{md}}}$  de  $-0,9\text{MPa}$  tras 13 días de sequía en plantas de elevada  $[\text{CO}_2]$  se alcanzó 3 días antes en plantas de  $[\text{CO}_2]$  ambiental.



**Fig. 5.9.** A) Correlación entre la actividad GDH-NADH y el potencial hídrico al mediodía ( $\Psi_{\text{w}_{\text{md}}}$ ). B) Correlación entre la actividad GDH-NAD<sup>+</sup> y el potencial hídrico al mediodía ( $\Psi_{\text{w}_{\text{md}}}$ ). Los círculos se corresponden con plantas regadas (valor medio de los controles de todo el experimento) y los cuadrados representan plantas en sequía durante 9, 13 ó 16 días. Elevada  $[\text{CO}_2]$  en color gris y  $[\text{CO}_2]$  ambiental en color naranja. Las líneas de tendencia y los factores de correlación se corresponden a funciones lineales (A) y funciones exponenciales (B).

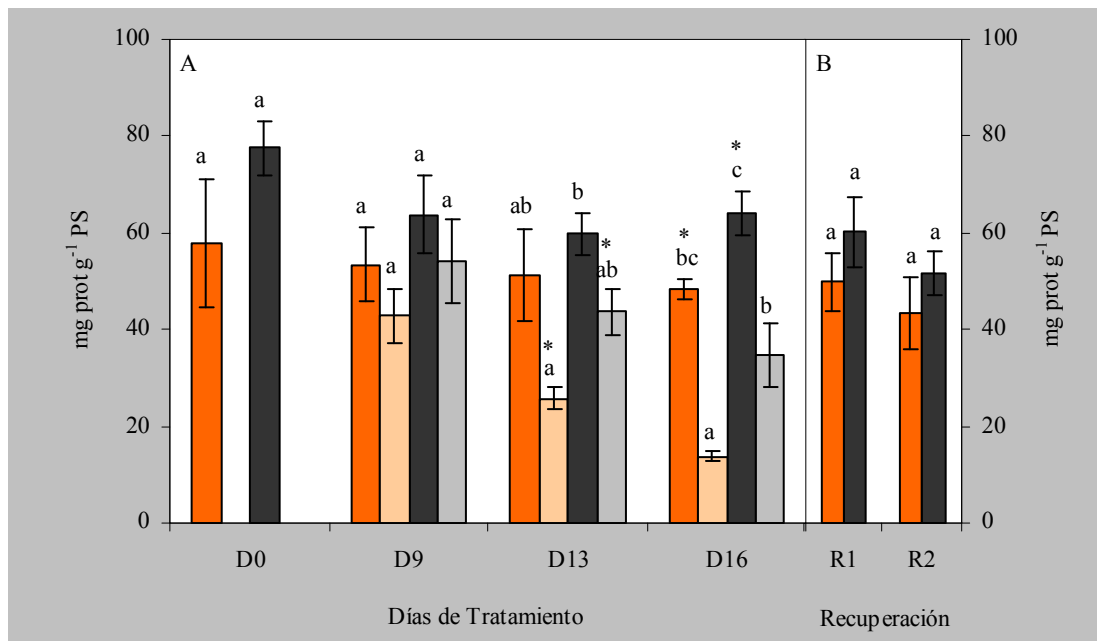
#### 5.2.4. Cuantificación de proteína soluble

El contenido en proteína soluble (Fig. 5.10) se vio afectado tanto por la sequía ( $P \leq 0,001$ ) como por la  $[\text{CO}_2]$  ( $P \leq 0,001$ ). El efecto del tiempo de exposición al tratamiento de las plantas sobre la cantidad de proteína soluble resultó significativo ( $P \leq 0,05$ ) (Fig. 5.10A).

El efecto de la sequía y del  $\text{CO}_2$  en los niveles de proteína se observa tanto en la figura 5.10 como en la figura 5.11. La sequía provocó un marcado descenso del contenido de proteína soluble expresado tanto en base al peso seco (Fig. 5.10A) como al área (Fig. 5.11A). Partiendo de valores de 58 y 78  $\text{mg prot g}^{-1}$  PS en  $[\text{CO}_2]$  ambiental y



elevada, respectivamente, tras 9 días de sequía las plantas mostraron valores de 43 mg prot g<sup>-1</sup> PS y 54 mg prot g<sup>-1</sup> PS en [CO<sub>2</sub>] ambiental y elevada, respectivamente.



| Parámetro | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|-----------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| Proteína  | ***             | *                   | ***    | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |

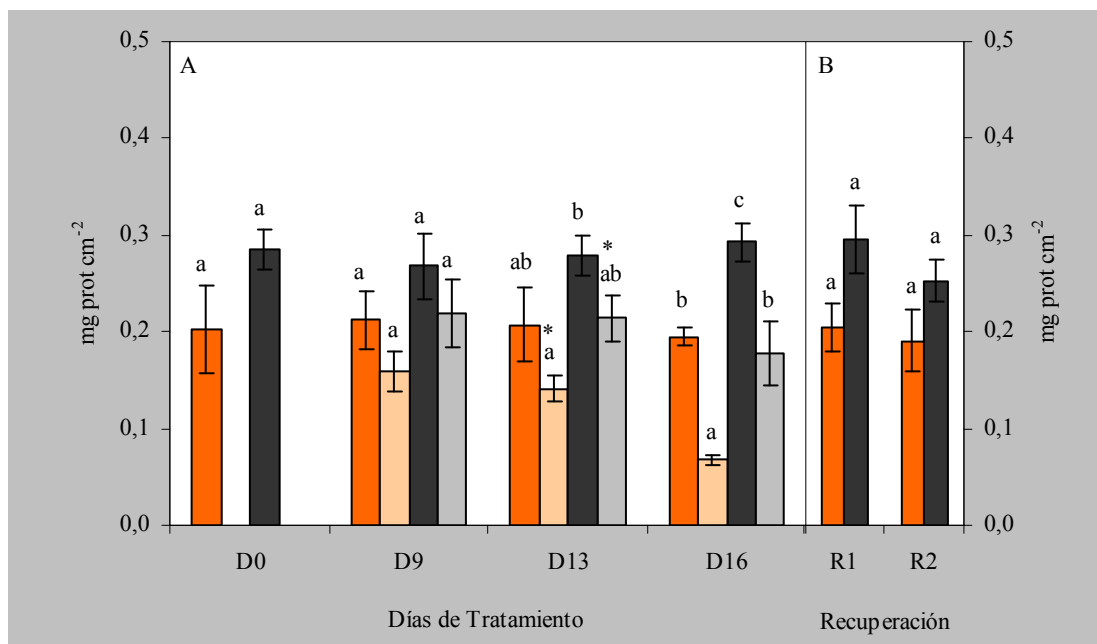
El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento.

**Fig. 5.10.** Interacción a lo largo del tiempo entre la sequía y el elevado CO<sub>2</sub> sobre el contenido de proteína soluble expresado por peso seco. Condiciones de crecimiento y análisis estadístico como en Fig. 5.2.

El descenso en el contenido proteico total continuó con la sequía hasta alcanzar, tras 16 días, valores mínimos de 14 mg prot g<sup>-1</sup> PS y 35 mg prot g<sup>-1</sup> PS en [CO<sub>2</sub>] ambiental y elevada, respectivamente. Esto supuso, respecto a sus correspondientes controles, un descenso del 71% y 46% a [CO<sub>2</sub>] ambiental y elevada, respectivamente (Fig. 5.10A).

Al estudiar el efecto del CO<sub>2</sub> se observó una respuesta diferencial. Comparando las plantas regadas a diferente [CO<sub>2</sub>] observamos que los valores control de los días 0, 9, 13 y 16 a elevada [CO<sub>2</sub>] son un 34%, 19%, 16% y 32% superiores, respectivamente que los de [CO<sub>2</sub>] ambiental. Comparando los tratamientos de sequía D9, D13 y D16, obtuvimos unos valores del 26%, 70% y 152% superiores, respectivamente, a elevada [CO<sub>2</sub>] comparado con [CO<sub>2</sub>] ambiental (Fig. 5.10).

Analizando la capacidad de recuperación (Fig. 5.10B) que tienen las plantas cuando se restablece el riego, observamos que el tratamiento R1 alcanzó un valor similar al de su respectivo control a  $[\text{CO}_2]$  ambiental y fue un 5% inferior a su respectivo control a  $[\text{CO}_2]$  elevada. R2 mostró valores superiores a los que tenía antes de la recuperación hídrica aunque todavía fueron inferiores (10% y 20% para  $[\text{CO}_2]$  ambiental y elevada, respectivamente) a los valores de los controles del último día del experimento (Fig. 5.10B).



| Parámetro | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|-----------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| Proteína  | ***             | n.s.                | ***    | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento.

**Fig. 5.11** Interacción a lo largo del tiempo entre la sequía y el elevado  $\text{CO}_2$  sobre el contenido de proteína soluble expresado por área foliar. Condiciones de crecimiento y análisis estadístico como en Fig. 5.2.

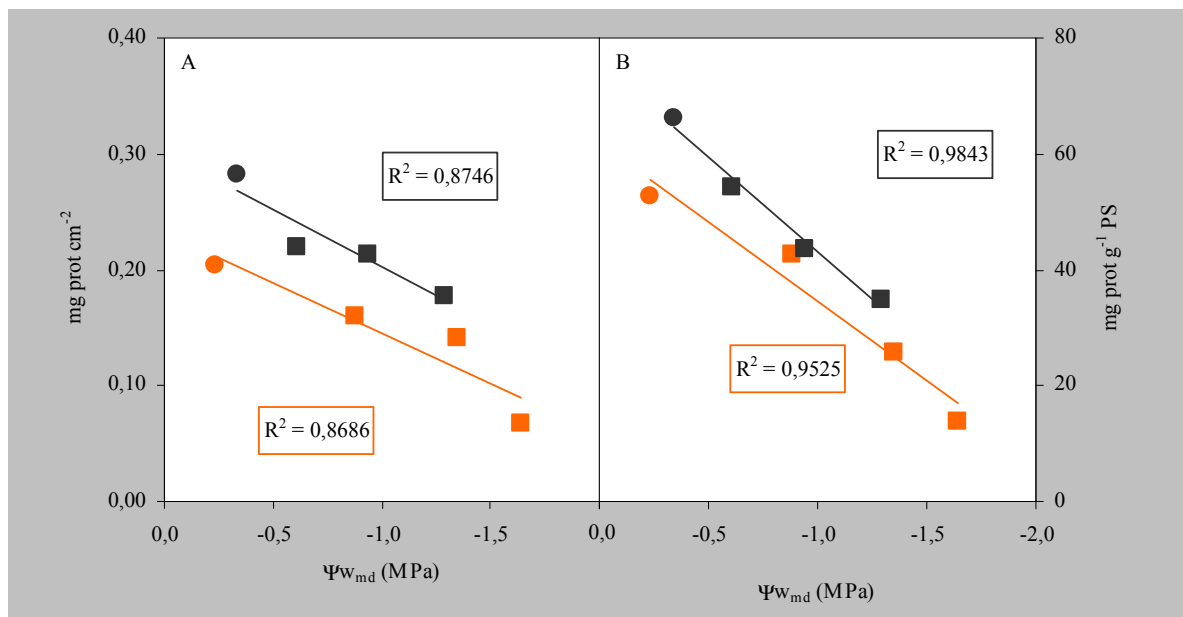
El contenido en proteína soluble por área (Fig. 5.11) se vio afectado tanto por la sequía ( $P \leq 0,001$ ) como por la  $[\text{CO}_2]$  ( $P \leq 0,001$ ).

La sequía provocó un marcado descenso del contenido en proteína (Fig. 5.10A). Tras 9 días de sequía mostraron caídas del 25% y 18% a  $[\text{CO}_2]$  ambiental y elevada, respectivamente. Después de 13 días de sequía los descensos fueron del 32% y 23% a  $[\text{CO}_2]$  ambiental y elevada, respectivamente y, tras 16 días de sequía, la caída en

proteínas fue del 65% y 39% a  $[\text{CO}_2]$  ambiental y elevada, respectivamente (Fig. 5.11A).

Al estudiar el efecto del  $\text{CO}_2$  se observó una respuesta diferencial. Así, el contenido de proteína al comienzo del estudio fue un 39% superior en las plantas crecidas a elevada  $[\text{CO}_2]$  que a  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Comparando los tratamientos de sequía D9, D13 y D16, obtuvimos contenidos un 38%, 51% y 165% superiores a elevada  $[\text{CO}_2]$  comparado con  $[\text{CO}_2]$  ambiental (Fig. 5.11A).

Analizando la capacidad de recuperación (Fig. 5.11B) que tienen las plantas cuando se restablece el riego, observamos que el tratamiento R1 sí alcanzó el valor similar al de su respectivo control bajo ambas  $[\text{CO}_2]$ . R2 mostró valores superiores a los que tenía antes del riego aunque todavía fueron inferiores (2% y 14% para  $[\text{CO}_2]$  ambiental y elevada, respectivamente) a los valores de los controles del último día del experimento (Fig. 5.11B).



**Fig. 5.12.** Correlación entre la concentración de proteína soluble y el potencial hídrico al mediodía ( $\Psi_{w_{md}}$ ), expresada por área foliar (A) o por peso seco (B). Los círculos se corresponden con plantas regadas (valor medio de los controles de todo el experimento) y los cuadrados representan plantas en sequía durante 9, 13 ó 16 días. Elevada  $[\text{CO}_2]$  en color gris y  $[\text{CO}_2]$  ambiental en color naranja.

Cuando comparamos la concentración de proteína soluble por área a  $\Psi_{w_{md}}$  similar y diferente  $[\text{CO}_2]$  (Fig. 5.12A) obtuvimos resultados superiores a  $[\text{CO}_2]$  elevada.

Esto es, para  $\Psi_{w_{md}}$  de -0,9MPa y de -1,3MPa la concentración de proteína soluble fue un 34% y un 26% superior, respectivamente, a elevada  $[CO_2]$  que a  $[CO_2]$  ambiental.

Al relacionar la concentración de proteína soluble por peso seco a  $\Psi_{w_{md}}$  similar pero diferente  $[CO_2]$  (Fig. 5.12B), obtuvimos resultados superiores a  $[CO_2]$  elevada. Esto es, para  $\Psi_{w_{md}}$  de -0,9MPa a elevada  $[CO_2]$  y de -1,3MPa a  $[CO_2]$  ambiental, la concentración de proteína soluble fue un 2% y un 35% superior, respectivamente.

## 5.3. Discusión

### 5.3.1. Reducción de nitrato

#### 5.3.1.1. Efecto de la sequía a $CO_2$ ambiental

La Nitrato Reductasa es uno de los enzimas más sensibles al estrés hídrico (Ferrario-Méry et al., 1998; Foyer et al., 1998). Cataliza la reducción del  $NO_3^-$  a  $NO_2^-$ , paso considerado limitante para la conversión del N en aminoácidos y por tanto para la síntesis de proteínas (Ferrario-Méry et al., 1998). Por ende, la síntesis y la actividad de los enzimas relacionados con la asimilación del nitrato, como NiR, GS, fd-GOGAT y GDH, también se ven afectadas por la sequía. Como la NR es un enzima inducible por sustrato y está regulado por numerosos metabolitos, su mecanismo de control durante el estrés hídrico parece complejo ya que incluye factores directos e indirectos. El déficit hídrico induce un marcado descenso en la toma de nitrato y en la tasa de su translocación de las raíces a las hojas (Somers et al., 1983; Bourgeais-Chaillou et al., 1992; Sibout y Guerrier, 1998; Baki et al., 2000). Así mismo, la sequía también interfiere en la inducción y síntesis de la proteína NR y en su actividad (Foyer et al., 1998).

En condiciones de sequía, tanto NR-EDTA como NR- $Mg^{2+}$  mostraron descensos pronunciados en su actividad enzimática siendo la actividad NR- $Mg^{2+}$  la que presentó una mayor sensibilidad (Fig. 5.3). Se sabe que la actividad medida en presencia de EDTA representa la actividad NR máxima o cantidad de proteína NR, y la determinada en presencia de  $Mg^{2+}$  se aproxima más a la tasa de reducción de nitrato *in vivo* (Kaiser et al., 2000a). El hecho de que hayamos obtenido mayor descenso de la actividad NR- $Mg^{2+}$  que de la actividad NR-EDTA estaría relacionado con la regulación de la actividad del enzima NR a través de los metabolitos y mecanismos que la activan y

desactivan. La sequía provoca efectos adversos sobre la expresión y actividad de la NR (Hsiao, 1973; Huber y Kaiser, 1996; Baki et al., 2000; El-Komy et al., 2003; Burman et al., 2004). A esta misma conclusión llegaron Kathju et al. (1990) y Krček et al. (2008) en estudios realizados con cebada. Xu y Zhou (2006a) también mostraron en *Leymus chinensis* que a medida que aumentaba el estrés hídrico la actividad NR-EDTA descendía gradualmente, indicando que la sequía reducía el contenido del enzima. En nuestros resultados pudimos observar una correlación positiva entre el descenso de la actividad NR, el descenso en el contenido de proteína soluble y la capacidad fotosintética en condiciones de estrés hídrico al igual que observaron El-Komy et al. (2003) y Burman et al. (2004).

Al analizar el estado de activación del enzima hemos observado que además de una pérdida la concentración del mismo provocada por el tiempo de exposición al tratamiento de la planta, la sequía juega un papel determinante provocando fuertes descensos en dicha activación. La actividad NR depende del flujo hídrico de la planta que a su vez influye en la toma de  $\text{NO}_3^-$  (Sinha y Nicholas, 1981; Ferrario-Méry et al., 1998; Foyer et al., 1998). En cebada, Wray y Filner (1970), y Aslam et al. (1973) observaron que la actividad NR estaba inducida por la presencia de nitrato, por tanto, el nivel de sustrato presenta un papel importante en la regulación de la actividad enzimática (Miller y Cramer, 2004). Como hemos visto en el Capítulo 4, las tasas de transpiración instantánea disminuyeron considerablemente cuando las plantas estaban sometidas a sequía como consecuencia de la caída de los valores del CHRS, entre el 10% y 40% (Capítulo 3). Ferrario-Méry et al. (1998) y Foyer et al. (1998) apuntaron que a pesar de la presencia de nitrato en las hojas se observaba una rápida pérdida de actividad NR, seguramente provocada por desnaturalización/inactivación o por degradación inducida por el estrés hídrico. Un hecho conocido es que la acumulación de nitrato se restringe a la vacuola a modo de reserva (Shanner y Boyer, 1974) y que es el nitrato citosólico el responsable de la inducción de la síntesis de la NR, de la estabilidad del enzima y de la actividad de la NR (Campbell, 1999). Varios son los factores que controlan la síntesis del enzima a nivel de expresión génica. El nitrato y la luz estimulan la síntesis del enzima. Parte del efecto de la luz es causado por la formación de carbohidratos en la fotosíntesis. La síntesis de la proteína NR es estimulada por la glucosa y demás azúcares producto de la fotosíntesis, y es inhibida por el amonio, la glutamina y otros aminoácidos.

Foyer et al. (1998) observaron en plantas de maíz sometidas a sequía un descenso gradual de la actividad NR. En experimentos llevados a cabo por Ferrario-Méry et al. (1998) en plantas de tabaco, transformadas para expresar la NR constitutiva, observaron que éstas mostraban inicialmente un aumento en la degradación de la proteína NR mediante proteasas y posteriormente un descenso en el nivel de mRNA cuando se sometían a estrés hídrico. Estos autores constataron que la expresión constitutiva de la NR retrasaba temporalmente la pérdida de actividad NR producida por sequía, y que la recuperación de la actividad fue más rápida después de la rehidratación.

Nosotros hemos observado una rápida recuperación de la actividad NR al restablecer el riego en los tratamientos de sequía, al igual que Silveira et al. (2001) quienes obtuvieron una recuperación de la actividad NR del 75% del control tan sólo un día después de rehidratar plantas de *Vigna unguiculata* L. (Walp.). Esto puede estar asociado con una elevada síntesis de proteína NR y con una recuperación del turgor foliar. En nuestros resultados observamos una rápida recuperación de la concentración de proteína soluble (Fig. 5.10) en la que se incluiría la proteína NR. Por otro lado, como se vio en el Capítulo 3, el estado hídrico general de la planta mejoró tras el restablecimiento del riego, recuperándose así tanto las tasas de transpiración como posiblemente, y en paralelo, la toma de nitrato.

### 5.3.1.2. Efecto de la sequía a elevada [CO<sub>2</sub>]

Las plantas mostraron diferente tasa de actividad NR en función de la [CO<sub>2</sub>] (Apartado 5.2.1). Así, las plantas que crecían a elevada [CO<sub>2</sub>] presentaron mayor actividad (30% NR-EDTA, Fig. 5.2, y 71% NR-Mg<sup>2+</sup>, Fig. 5.3) respecto a las de [CO<sub>2</sub>] ambiental. Altas [CO<sub>2</sub>] también producían un incremento en la actividad NR en plantas de tabaco (Matt et al., 2001) y en *Vigna radiata* (Sharma y Sen Gupta, 1990). Durante exposiciones cortas a elevado CO<sub>2</sub> las altas tasas de asimilación de CO<sub>2</sub> mejoraron la reducción del nitrógeno estimulando la síntesis y actividad de la NR (Larios et al., 2001). Geiger et al. (1998) vieron que plantas de tabaco expuestas durante largos periodos de tiempo a elevado CO<sub>2</sub> incrementaban su actividad NR paralelamente a los cambios en la regulación diurna de la NR en hoja y raíz, donde el aumento en el suministro de azúcares juega un papel importante. Sin embargo, otros estudios han encontrado inalterada o disminuida la actividad NR a elevado CO<sub>2</sub> como en espinaca

(Kaiser et al., 2000b) y en *Nicotiana plumbaginifolia* aunque no se vio afectado el estado de activación (Ferrario-Méry et al., 1997). El CO<sub>2</sub> tuvo más efecto sobre la actividad NR-Mg<sup>2+</sup> que sobre la NR-EDTA. En condiciones de riego y elevado CO<sub>2</sub> las plantas tuvieron mayor asimilación fotosintética (Capítulo 4) y mejor estado hídrico (Capítulo 3) que a [CO<sub>2</sub>] ambiental, con lo que aumentaron las condiciones celulares óptimas para la activación del enzima. De forma similar respondieron las plantas sometidas a sequía y elevado CO<sub>2</sub>.

Cuando las plantas se sometían a sequía se observó, al igual que ocurría a CO<sub>2</sub> ambiental, un marcado descenso del estado de activación. Como se ha descrito anteriormente, tanto la actividad máxima como la actividad real están afectadas por la sequía. El hecho de que descienda el estado de activación es consecuencia del mayor efecto de la sequía sobre la actividad real (82%) que sobre la máxima (45%).

El estado de activación fue superior a elevada [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental tanto en los tratamientos de riego como en los de sequía, aunque las diferencias fueron mayores en los tratamientos de sequía. Agüera et al. (2006) observaron que tras 14 días de exposición a elevada [CO<sub>2</sub>] plantas de *Cucumis sativus* no mostraron ninguna variación ni en el nivel de síntesis del enzima - deducido del ensayo en ausencia de Mg<sup>2+</sup> -, ni en el nivel de actividad del enzima - en presencia de Mg<sup>2+</sup>. Este hecho mostraba que el estado de activación del enzima tampoco varió. Aún así, existen algunos trabajos que señalan que esta forma de estimar el estado de activación no es la más fidedigna (Tucker et al., 2004). En nuestro experimento hemos visto que la actividad NR-Mg<sup>2+</sup> se vio más afectada que la NR-EDTA y, por lo tanto, sí que se afectó el estado de activación. Kaiser y Brendle-Behnisch (1991) también observaron una rápida inactivación del enzima NR a la luz cuando disminuyó la [CO<sub>2</sub>] atmosférica hasta dejar el aire libre de CO<sub>2</sub>. Esto indica que a elevada [CO<sub>2</sub>], para un mismo periodo de tiempo, se mantiene mejor el estado hídrico de la planta y con ello la fotosíntesis y la síntesis de proteínas entre las que se encuentra la NR.

Por otro lado, algunos estudios han constatado que el contenido de nitrógeno por planta aumentaba en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> aún cuando la relación C/N aumentaba (Wong 1979; Hocking y Meyer 1991b; Chu et al., 1992; Tissue et al., 1997). Además, en la misma variedad de cebada, Iranis, se ha observado un 17% más de nitrato en elevada [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental (Pérez-López, 2008). Estos resultados indican que la elevada [CO<sub>2</sub>] puede inducir una mayor toma de nitrato a pesar de presentar menores tasas de transpiración. En nuestros datos hemos observado actividades de

asimilación de nitrato mayores a elevada  $[\text{CO}_2]$  que a  $[\text{CO}_2]$  ambiental. En relación a esto, Pérez-López (2008) constató que las mayores tasas de toma específica y translocación de nitrato en cebada Iranis a elevada  $[\text{CO}_2]$  se correlacionaban con tasas superiores de actividad NR-Mg<sup>2+</sup>. También hemos observado un mayor crecimiento, tanto de la parte aérea como de la radical a elevada  $[\text{CO}_2]$  (Capítulo 6). Es conocido que plantas creciendo a elevada  $[\text{CO}_2]$  poseen un mayor sistema radicular que les permite explorar un mayor volumen de suelo (Pettersson et al., 1993; Jackson y Reynolds, 1996; Drake et al., 1997). También se ha descrito, en algunas especies arbóreas, un incremento de la formación lateral y secundaria de raíces bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  (Pettersson et al., 1993; Larigauderie et al., 1994; Tingey et al., 1996). Así, en especies como *Pinus taeda* y *Prosopis glandulosa* se ha observado que el elevado  $\text{CO}_2$  aumenta la tasa de toma de nitrógeno por unidad de peso radicular (Bassirad et al., 1996, 1997). Sin embargo, la toma de N no se vio alterada en *Nardus agrostis* (Bassirad et al., 1997) o disminuyó en otras especies (Jackson y Reynolds, 1996).

Es importante destacar que mayores tasas de actividad NR-EDTA y NR-Mg<sup>2+</sup> (Fig. 5.4) se correspondían con un  $\Psi_{\text{wmd}}$  más positivo en plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$  que a  $[\text{CO}_2]$  ambiental.

### 5.3.2. Asimilación de amonio

#### 5.3.2.1. Glutamina sintetasa. Efecto de la sequía y de la $[\text{CO}_2]$

En condiciones de sequía, hemos observado que la actividad GS disminuía, bajo ambas concentraciones de  $\text{CO}_2$ . También, Xu y Zhou (2006b) vieron en *Leymus chinensis* que el estrés hídrico ocasionaba un marcado descenso de la actividad GS hasta alcanzar un estrés hídrico moderado (-1,23MPa aproximadamente) y posteriormente este descenso era más atenuado a medida que el estrés se hacía más intenso (-1,73MPa). Como señalaron Hsu et al. (2003) en hojas de arroz sometidas a estrés hídrico, el contenido en proteínas descendió significativamente y la concentración de amonio aumentó a medida que la actividad GS disminuyó.

Cuando se analizó el efecto del  $\text{CO}_2$  sobre la actividad GS siempre se obtuvo una mayor actividad a elevada  $[\text{CO}_2]$  que a  $[\text{CO}_2]$  ambiental, tanto en riego como en sequía. Bajo elevada  $[\text{CO}_2]$ , la asimilación de amonio proveniente de la reducción del nitrato resultaría quizás más relevante ya que las tasas de fotorrespiración están



reducidas (Tabla 4.7) y, por tanto, la necesidad de reciclar el amonio fotorrespiratorio sería menor (Stitt y Krapp, 1999). Este descenso de la fotorrespiración explica un decremento sustancial en los niveles de amonio, glicina y serina a elevado  $\text{CO}_2$  (Ferrario-Mery et al., 1997; Geiger et al., 1998). Por el contrario, una sequía moderada (entre -1MPa y -2MPa) aumentaría la fotorrespiración y, con ello, la necesidad de reciclar el amonio resultante (Wingler et al., 1999).

Al igual que para la NR, la expresión y actividad del enzima GS en hojas está modulada por la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  después de una leve exposición a elevado  $\text{CO}_2$  atmosférico, y los azúcares fotosintetizados están presuntamente implicados como metabolitos reguladores positivos (Larios et al., 2004). En este sentido, además, una mayor tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$  se traduciría en una mayor disponibilidad de esqueletos carbonados para la asimilación de amonio y la síntesis de aminoácidos. Un papel importante de la mitocondria en los tejidos vegetales es la producción y exportación del  $\alpha$ -cetoglutarato. Como ya se ha descrito, uno de los pasos clave en la asimilación del amonio mediante el sistema GS/GOGAT es el origen del  $\alpha$ -cetoglutarato que sirve de sustrato a la GOGAT. Lancien et al. (2000) han propuesto varias hipótesis para comprender el flujo de carbono desde los carbohidratos a la provisión de esqueletos carbonados para la asimilación primaria del amonio, sugiriendo un papel relevante a la isocitrato deshidrogenasa en este flujo. Sin embargo, aunque Hodges (2002) concluyó que aún no se conoce el origen exacto del  $\alpha$ -cetoglutarato para la asimilación del amonio se sabe que la única fuente de este  $\alpha$ -cetoácido es el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT), donde además es un importante intermediario. La formación del  $\alpha$ -cetoglutarato es de gran importancia en el mantenimiento del equilibrio metabólico del carbono y del nitrógeno así como en la conversión de aminoácidos a amidas u otros compuestos nitrogenados para el transporte en el citosol y los plastidios. Las mayores tasas de asimilación fotosintética a elevada  $[\text{CO}_2]$  aportarían mayor cantidad de carbohidratos hacia el CAT, favoreciendo mayores tasas de actividad GS.

Además, se observó una correlación positiva entre la actividad GS y el  $\Psi_{\text{wmd}}$  (Fig. 5.6) bajo ambas  $[\text{CO}_2]$ . En ella se puede ver cómo para un mismo estado hídrico se obtuvo mayor actividad GS (40%) en las plantas crecidas a elevada  $[\text{CO}_2]$  que en las de  $[\text{CO}_2]$  ambiental, teniendo estas 3-4 días más de edad.

La rápida recuperación del proceso de asimilación de amonio tras la rehidratación hizo que obtuviéramos datos de actividad GS similares al control, tanto

bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  como a  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Una respuesta similar obtuvieron [Bhatti et al. \(2000\)](#) cuando estudiaron la actividad GS en tomate tras la rehidratación después de someterlas a un estrés hídrico con disponibilidad del 30% del agua del suelo.

### 5.3.2.2. Glutamato deshidrogenasa. Efecto de la sequía y de la $[\text{CO}_2]$

En condiciones de sequía, tanto la fotosíntesis como la tasa de toma de N descienden debido al menor flujo hídrico de la raíz a las hojas lo que provoca una caída importante de la transpiración y, por lo tanto, un cierre estomático considerable. Se considera que la limitación estomática disminuye tanto la asimilación como la concentración de  $\text{CO}_2$  en los espacios intercelulares de la hoja lo cual inhibe el metabolismo fotosintético ([Kaiser 1987](#); [Downton et al., 1988](#); [Cornic, 2000](#)). De este modo, [Kaiser \(1987\)](#) y [Kaiser y Foster \(1989\)](#) concluyeron que la asimilación de N podía verse inhibida por la baja  $C_i$ . Posteriormente, por medio de la GOGAT, cuando la glutamina formada a partir del amonio liberado reacciona con el  $\alpha$ -cetoglutarato para formar glutamato, se requiere ATP. Está considerado que la primera repercusión del descenso del contenido hídrico relativo en condiciones de sequía es la menor actividad de la ATP sintasa ([Keck y Boyer, 1974](#); [Tezara et al., 1999](#)). Si la disponibilidad de ATP está limitada como consecuencia del estrés hídrico, la asimilación del amonio por la GS/GOGAT se ve disminuida o inhibida, siendo la GDH una ruta alternativa para la síntesis de glutamato.

Sin embargo, la sequía tuvo un efecto negativo sobre la actividad GDH-NADH disminuyéndola hasta un 24%. Resultados similares se obtuvieron en estudios realizados con cebada ([Kathju et al., 1990](#); [Krčėk et al., 2008](#)) y *Leymus chinensis* ([Xu y Zhou, 2006b](#)) donde se vio que a medida que el estrés hídrico aumentaba, la actividad GDH-NADH descendía gradualmente, indicando que la sequía inhibía la actividad GDH en sentido aminante. En nuestro estudio la respuesta fue similar bajo ambas  $[\text{CO}_2]$ . Por tanto, el elevado  $\text{CO}_2$  no modificó la respuesta de la GDH en sentido aminante. Otros autores como [Ponce-Valadez y Watkins \(2008\)](#) tampoco han encontrado efecto del elevado  $\text{CO}_2$  atmosférico en la actividad GDH aminante en un estudio llevado a cabo con dos cultivares de fresa. Por otro lado, ha sido propuesto que el amonio podría ser asimilado por la GDH-NADH cuando la GS/GOGAT es inhibida bajo condiciones de estrés ([Oaks, 1995](#)), tales como sequía ([Mena-Petite et al., 2006](#)) o

salinidad (Skopelitis et al., 2006), o cuando la GS está inhibida por análogos al glutamato como la fosfotricina (Lacuesta et al., 1989; González-Moro et al., 1993, 2000). Sin embargo, en nuestro caso, el estrés impuesto por los 16 días de sequía sobre las plantas de cebada no alteró significativamente la actividad aminante.

En el análisis de la actividad GDH-NAD<sup>+</sup>, se observaron efectos significativos tanto de la sequía como de la [CO<sub>2</sub>] de crecimiento. La GDH es un enzima ligado a actividades catabólicas, como la degradación de proteínas. La actividad del CAT en la mitocondria produce ácidos orgánicos utilizando el carbono de la sacarosa u otros hidratos de carbono de almacenamiento, los cuales son consumidos en la mayoría de las plantas estresadas. Probablemente las reacciones de la GDH sean más importantes cuando el CHR cae porque el glutamato se acumula (Lawlor y Fock, 1977) particularmente cuando la asimilación fotosintética es muy baja (Lawlor, 2002). En resumen, se provoca un desequilibrio en la relación C/N y la situación requiere que el enzima GDH funcione liberando  $\alpha$ -cetoglutarato a partir de glutamato, en sentido desaminante (Mifflin y Habash, 2002; Stewart et al., 1995). Teniendo todo esto en cuenta, Lea y Mifflin (2003) apuntan al catabolismo de aminoácidos como posible función principal del enzima GDH con el fin de liberar amonio que se incorpore después a amidas durante la removilización del nitrógeno.

La GDH desaminante actuaría reponiendo el  $\alpha$ -cetoglutarato necesario para el funcionamiento adecuado del CAT en la mitocondria. Por otro lado, la presencia de  $\alpha$ -cetoglutarato es necesaria para que la GS siga incorporando glutamina y formando glutamato. Bajo condiciones de estrés, Glevarec et al. (2004) han sugerido que la actividad catabólica de la GDH serviría más para mantener en equilibrio la producción de glutamato que para proporcionar  $\alpha$ -cetoglutarato, ya que el contenido de glutamato debe estar altamente regulado teniendo en cuenta su papel metabólico en la formación de aminoácidos en general y de prolina, en particular, relacionada con la osmorregulación de plantas en sequía (Venekamp, 1989).

Por otro lado, el glutamato fue más demandado por la GDH-NAD<sup>+</sup> para actuar en sentido desaminante y proporcionar esqueletos carbonados y una fuente de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos y proteínas durante la remobilización del nitrógeno en condiciones de sequía. Añadido a esto, hemos observado que así como la GS responde a la diferente [CO<sub>2</sub>], la GDH-NADH no modificaba su actividad al variar la [CO<sub>2</sub>] aunque sí la GDH-NAD<sup>+</sup>. En este sentido, las plantas sometidas a elevada [CO<sub>2</sub>] y sequía

presentaban 1) una menor necesidad de removilizar el nitrógeno previamente asimilado y por lo tanto menos actividad GDH-NAD<sup>+</sup>, porque mantenían un flujo de nitrógeno, de la raíz a la parte aérea, mejor que a [CO<sub>2</sub>] ambiental, y 2) mostraban igualmente unas mejores tasas fotosintéticas y, en definitiva, mejores tasas de asimilación del nitrógeno vía GS/GOGAT.

Cuando se analizó el efecto de la [CO<sub>2</sub>] en plantas que presentaban un mismo estado hídrico se observó que la actividad GDH-NADH era similar. En cambio, la actividad GDH-NAD<sup>+</sup>, a potenciales menores que -1MPa, presentaba valores superiores a [CO<sub>2</sub>] ambiental que a elevada [CO<sub>2</sub>] (Fig. 5.9).

Tras el restablecimiento del riego, cuando el estado hídrico fue recuperado y la fotosíntesis proporcionó energía y esqueletos carbonados necesarios para el metabolismo del nitrógeno, se vio una clara tendencia de la GDH-NAD<sup>+</sup> a minimizar su actividad y mostrar valores similares a los del control con lo que las vías aminante y desaminante de la GDH llegaron a un equilibrio fisiológico similar al que se da en condiciones de control-riego.

### 5.3.3. Proteína soluble. Efecto de la sequía y de la [CO<sub>2</sub>]

En nuestro estudio hemos observado que la sequía afectó sustancialmente al contenido de proteína soluble. Se mostraron descensos de hasta un 71% cuando se expresaban por peso seco y de hasta un 65% cuando se expresaban por área foliar. [Mohammadkhani y Heidari \(2008\)](#) en dos cultivares de maíz sometidos a estrés hídrico que alcanzaron -1,76MPa, mostraron un descenso del 30% en el contenido de proteína soluble expresado por peso seco. [Xu y Zhou \(2006a\)](#), y [Xu y Yu \(2006\)](#) también obtuvieron un efecto significativamente negativo de la sequía moderada y severa sobre el contenido proteico soluble de *Leymus chinensis* y trigo, respectivamente. El desequilibrio metabólico provocado por el estrés hídrico desencadena una acumulación de aminoácidos, una menor síntesis de ATP y RuBP y una alteración en la síntesis de proteínas ([Lawlor y Cornic, 2002](#)).

Por otro lado, el CO<sub>2</sub> también ejerció un efecto significativo sobre el contenido en proteína soluble. En estudios llevados a cabo por [Pérez-López et al. \(2008\)](#) en la variedad de cebada Iranis se obtuvo un mayor contenido de proteína soluble por planta bajo elevada [CO<sub>2</sub>] a pesar de producirse un fuerte efecto de dilución ya que al analizar

el contenido en almidón como carbohidrato estructural se observó un 60% más en plantas creciendo a 700ppm que a 350ppm de CO<sub>2</sub>. Esto sugiere que, posiblemente, se esté dando un efecto de dilución cuando expresamos la cantidad de proteínas por peso seco, debido a la acumulación de carbohidratos no estructurales.

Tanto en plantas regadas como en sequía, el contenido proteico total fue mayor a elevada [CO<sub>2</sub>] comparado con [CO<sub>2</sub>] ambiental a pesar de un aumento significativo de los parámetros de crecimiento a elevada [CO<sub>2</sub>] (Capítulo 6). El hecho de que otros autores como [Tezara et al. \(2002\)](#) hayan obtenido a elevada [CO<sub>2</sub>] descensos pronunciados en el contenido de proteína en girasol cuando viene expresado por biomasa total, puede ser explicado por un gran aumento de biomasa total en plantas creciendo en estas condiciones de CO<sub>2</sub>. Otros autores, como [Ziska et al. \(1995\)](#), atribuyen este descenso de contenido en proteína soluble de *Beta vulgaris* en condiciones de elevada [CO<sub>2</sub>] a una redistribución hacia nuevos sumideros.

Bajo condiciones similares de  $\Psi_{w_{md}}$  el nivel de proteína disminuyó de forma lineal bajo ambas [CO<sub>2</sub>], tanto si se expresaba por área como por peso seco. Observamos que, en concordancia con el resto de parámetros estudiados, a elevada [CO<sub>2</sub>] y para un mismo  $\Psi_{w_{md}}$  la cantidad de proteína fue superior que a [CO<sub>2</sub>] ambiental. Como fue señalado por [Pérez-López \(2008\)](#), las tasas de toma y translocación de N fueron superiores a elevada [CO<sub>2</sub>] en cebada cv. Iranis.

Por otro lado, tal y como señalaron [Hirel et al. \(2005\)](#) para evaluar el nivel de N foliar han de tenerse en cuenta el contenido de proteína soluble y el contenido total de N foliar y de clorofilas. Según estos parámetros, tanto bajo condiciones de sequía como de riego y elevada [CO<sub>2</sub>] la disponibilidad de N para la síntesis de proteínas siempre fue más elevada que en plantas de [CO<sub>2</sub>] ambiental.

Al igual que en el caso de las actividades enzimáticas NR, GS y GDH, obtuvimos una recuperación del contenido de proteína soluble al restablecer el riego. Esto indicó que aunque en nuestro estudio se aplicó un estrés severo, éste era recuperable. [Farooq y Bano \(2006\)](#) obtuvieron también una total recuperación del contenido en proteína soluble en plantas de *Vigna radiata* L. que permanecieron durante 12 días sin riego tras los cuales fueron rehidratados durante otros 12 días.

## 5.4. Conclusiones

- El estrés hídrico reduce las actividades de los enzimas clave del metabolismo del N analizados en cebada. Los enzimas NR-EDTA, NR-Mg<sup>2+</sup>, GS y GDH-NADH presentaron menores actividades a causa de la sequía. Por otro lado, el enzima GDH en sentido desaminante, GDH-NAD<sup>+</sup>, mostró un marcado aumento de la actividad en condiciones de sequía, seguramente para proporcionar esqueletos carbonados ya que la sequía ocasiona un concomitante descenso de la asimilación de carbono en la planta. El contenido en proteína soluble disminuyó bruscamente con la sequía, fruto de un menor flujo del sustrato a la planta y, por tanto, de una menor asimilación de nitrógeno.
- El efecto del elevado CO<sub>2</sub> sobre las enzimas NR, GS, GDH-NAD<sup>+</sup> y sobre el contenido en proteína fue significativo tanto si las plantas se regaban como si se sometían a sequía. Debemos destacar que el efecto de la [CO<sub>2</sub>] era mayor en las plantas de sequía que en las regadas. La actividad GDH-NADH no se vio afectada significativamente por la [CO<sub>2</sub>]. La elevada [CO<sub>2</sub>] estimula la reducción de nitrato y la posterior incorporación del amonio. Las plantas sometidas a estrés hídrico mantienen las actividades NR, GS, GDH-NAD<sup>+</sup> más altas que las plantas en sequía y [CO<sub>2</sub>] ambiental. Este hecho proporciona mejores condiciones de crecimiento a las plantas sometidas a elevada [CO<sub>2</sub>] permitiendo un mayor desarrollo del cultivo que a las plantas de [CO<sub>2</sub>] ambiental.
- La capacidad de las plantas para recuperarse tras el restablecimiento del riego fue constatado en todos los parámetros estudiados en este capítulo. Tan solo cabe mencionar que la actividad GDH-NAD<sup>+</sup> fue la que mostró una mayor diferencia con sus respectivos controles aunque tendía hacia ellos. Esto confirma que a pesar de que el estrés hídrico alcanzado en el presente trabajo apareció bajo ambas [CO<sub>2</sub>], era entre moderado (S9) y severo (S13 y S16), sus efectos se mostraron reversibles.
- El elevado CO<sub>2</sub> aceleró y mejoró la recuperación del metabolismo del nitrógeno tras la rehidratación.



# SEXTO CAPÍTULO

## CRECIMIENTO

### 6.1. Introducción y objetivos

### 6.2. Resultados

#### 6.2.1. Aspectos morfológicos del desarrollo

#### 6.2.2. Parámetros absolutos

#### 6.2.3. Parámetros relativos

### 6.3. Discusión

#### 6.3.1. Parámetros absolutos

#### 6.3.2. Parámetros relativos

### 6.4. Conclusiones





## 6.1. Introducción y objetivos

La Península Ibérica, por su situación y topografía, es uno de los lugares donde se espera que los cambios fenológicos debidos al cambio climático sean más importantes (Valladares et al., 2005). Diversas especies anticipan el brote de las hojas al aumentar la temperatura aunque otras especies parecen inmutables al cambio de temperatura por ser más dependientes de otros factores como la disponibilidad hídrica o el fotoperiodo (Peñuelas et al., 2002). En muchos otros lugares del planeta, han sido descritas respuestas similares en el adelantamiento de las fenofases de plantas de unos 3-4 días por década en primavera (Peñuelas y Filella, 2001; Walther et al., 2002; Parmesan y Yohe, 2003), de manera que éste parece ser un fenómeno general, con la variabilidad regional, local y específica propia de todo fenómeno biológico. Por otro lado, la mayoría de los escenarios climáticos afectados por el cambio climático predicen un aumento de zonas áridas a lo largo de todo el planeta (IPCC, 2007) así como el subsecuente estrés hídrico para los cultivos.

El proceso de fijación de CO<sub>2</sub> es un prerequisite para el crecimiento (Duncan y Hesketh, 1968; Dijkstra y Lambers, 1989; Poorter et al., 1990). Sin embargo, tan sólo se trata del primer paso de una serie de reacciones bioquímicas que conducen a la producción de biomasa (Poorter y Bergkotte, 1992). El contenido en carbono en la biomasa vegetal es el parámetro que establece un puente entre la tasa de crecimiento de la planta, por un lado, y las tasas de fotosíntesis y respiración por unidad de peso vegetal, por el otro.

La tasa de crecimiento depende del número de meristemas activos, y de las tasas de división y elongación celular. El elevado CO<sub>2</sub> produce un acortamiento del ciclo celular en los meristemas de la raíz y de la parte aérea (Kinsman et al., 1997). En general, el crecimiento es más rápido en plantas jóvenes y luego disminuye a medida que la planta envejece (Masle et al., 1993; Geiger et al., 1998). El efecto del elevado CO<sub>2</sub> en el crecimiento también depende del tiempo de exposición al tratamiento de la planta. En numerosos estudios de larga exposición a elevada [CO<sub>2</sub>] se ha visto que la estimulación del crecimiento se da cuando las plantas son jóvenes, en cambio, las tasas de crecimiento no se ven afectadas cuando las plantas envejecen. El elevado CO<sub>2</sub>, además, conduce a cambios en la localización de la biomasa y en la fenología lo cual se observa en un aumento del cociente raíz: parte aérea (R/A), encamado, mayor

ahijamiento y floración más temprana (Bazzaz y Fajer, 1992; Tissue et al., 1997). En condiciones de elevada  $[\text{CO}_2]$  es importante tener en cuenta que las variaciones en el ahijamiento (Tissue et al., 1997), el encamado (Baxter et al., 1997), la producción de tubérculos (Heineke et al., 1999), así como la floración temprana (Bazzaz y Fajer, 1992), pueden ser debidas no exclusivamente al aumento del nivel de carbohidratos, sino también a la interacción con el nitrógeno (Stitt y Krapp, 1999).

Por otro lado, las plantas han desarrollado una amplia diversidad de mecanismos morfológicos y fisiológicos para tolerar la sequía (Blum, 1996). El estrés hídrico puede afectar de diferente manera al crecimiento de los distintos órganos de la planta (Sobrado y Turner, 1986; Spollen et al., 1993), lo cual podría modificar las características morfológicas de las mismas (French y Turner, 1991; Cox y Conran, 1996). Uno de los mecanismos involucrados en la adaptación de las plantas a la sequía es el cambio en el cociente R/A (Turner, 1997). Si bien el estrés por sequía reduce el crecimiento tanto de la parte radical como de la parte aérea, parece que la raíz puede verse menos afectada (Liu y Stützel, 2004; Yin et al., 2004; Erice et al., 2006). En respuesta al estrés hídrico causado por la sequía, las plantas son capaces de controlar las pérdidas de agua por transpiración reduciendo la tasa de expansión celular para prevenir la deshidratación de los tejidos foliares (Liu y Stützel, 2002a, b) lo que se traduce en menor crecimiento general.

Además, la tasa de difusión de  $\text{CO}_2$  desde el aire hacia los estomas es el factor limitante para la asimilación fotosintética. Como dicha tasa de difusión es proporcional al gradiente de concentración entre el interior y el exterior de la hoja, altas  $[\text{CO}_2]$  generalmente estimulan la tasa de asimilación neta de  $\text{CO}_2$  (Cure y Acock, 1986; Allen et al., 1987; Amthor, 1995) y también podrían reducir las pérdidas por transpiración (Allen, 1990; Allen y Amthor, 1995). El elevado  $\text{CO}_2$  también puede promover una reversión completa de los efectos negativos provocados por determinados estreses ambientales (Ferris et al., 1998). De acuerdo a Pritchard et al. (1999), el mayor efecto significativo del elevado  $\text{CO}_2$  sobre el crecimiento vegetal es el aumento en la disponibilidad de carbohidratos y en la eficiencia en el uso del agua. Así, combinados, estimularían la proliferación celular favoreciendo la división celular y/o la expansión celular. Según Murray (1995) las especies C3 son capaces de utilizar un extra de  $\text{CO}_2$  para soportar mayor tasa de crecimiento, especialmente durante los estadios más tempranos del desarrollo.

El objetivo general del presente estudio ha sido analizar los efectos combinados de la elevada concentración de CO<sub>2</sub> y la sequía en los patrones de crecimiento y desarrollo en plantas de cebada y, concretamente:

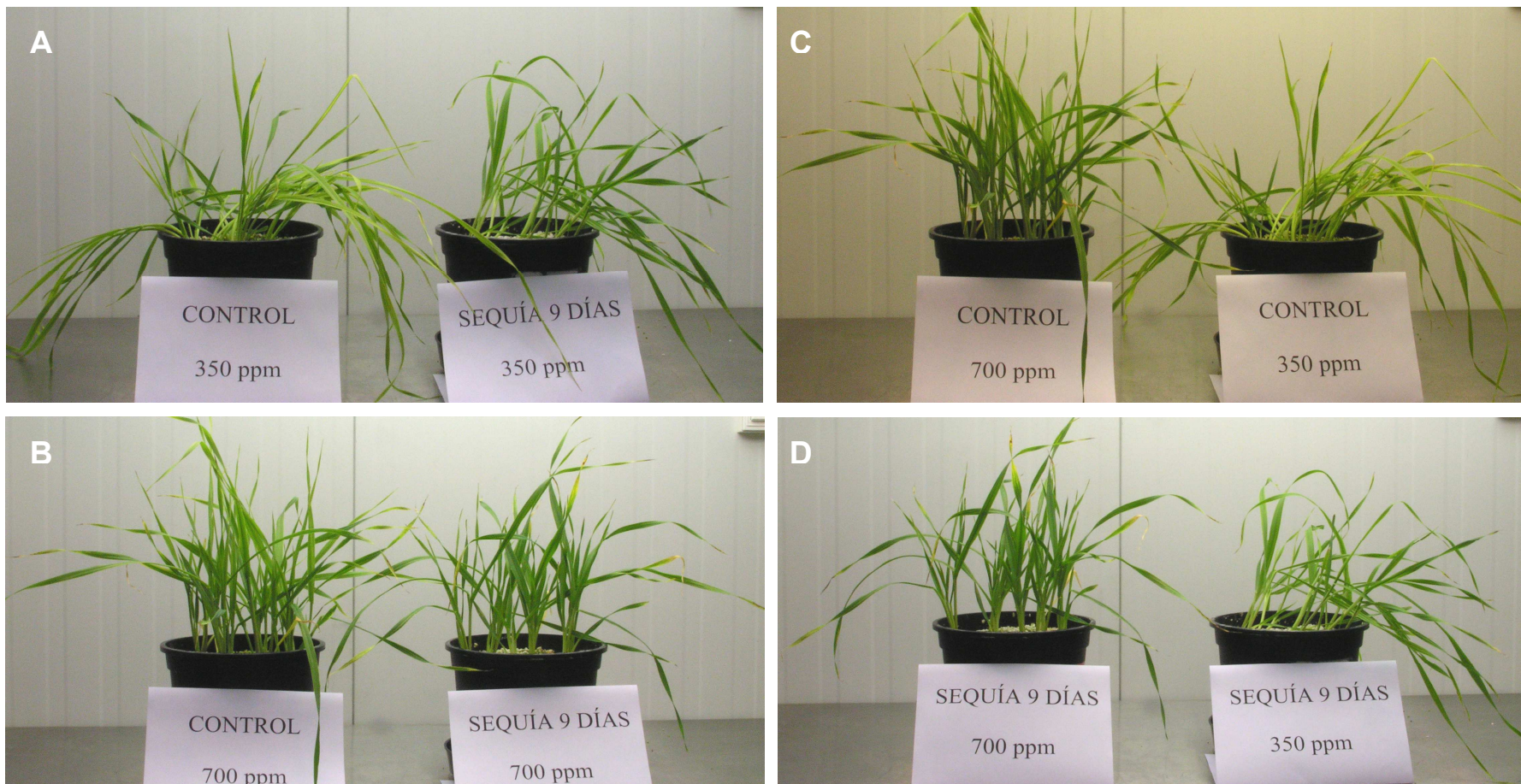
- Analizar si el aumento de CO<sub>2</sub> modifica la producción de biomasa y estudiar si dicho enriquecimiento en CO<sub>2</sub> mitiga o potencia el efecto negativo de la sequía.
- Dilucidar qué conjunto de parámetros de crecimiento, absolutos y/o relativos, son los responsables del descenso o aumento de la producción de biomasa en condiciones de sequía y elevada [CO<sub>2</sub>].
- Evaluar la capacidad de las plantas para recuperarse del estrés hídrico, bajo ambas condiciones de [CO<sub>2</sub>], ambiental y elevada.

Para llevar a cabo estos objetivos, se analizaron los parámetros de crecimiento absolutos de producción de biomasa del vástago, de la raíz y, por lo tanto, de la biomasa total, así como el área de la parte aérea y la eficiencia en el uso del agua por planta entera (*EUA*). Estas medidas se realizaron durante todos los días en los que se realizaron análisis hídricos, fotosintéticos y del metabolismo del nitrógeno, concretamente, los días D0, D9, D13 y D16. Así mismo, a partir de los parámetros absolutos se calcularon los parámetros relativos que nos informan de la respuesta morfológica y funcional de la planta a la [CO<sub>2</sub>] y al estrés hídrico. Estos parámetros relativos fueron la tasa de crecimiento relativo (RGR), la tasa de asimilación neta (NAR) que da una idea de la componente funcional, la relación entre el área de la parte aérea y el peso seco total de la planta (LAR), la proporción de la biomasa del vástago frente al peso seco total (LWR) y la relación entre el área de la parte aérea y el peso seco del vástago de la planta (SLA).

## **6.2. Resultados**

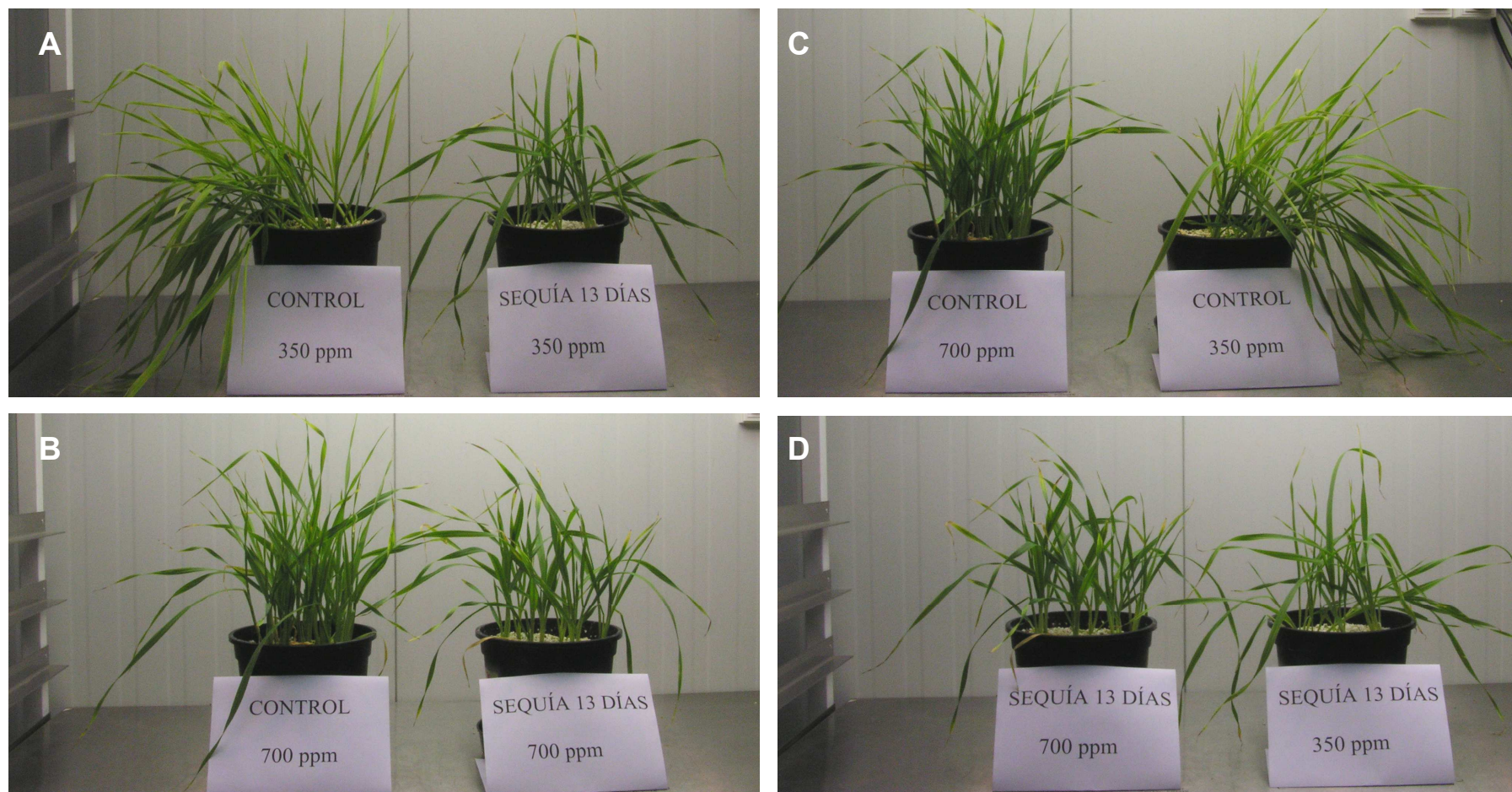
### **6.2.1. Aspectos morfológicos del desarrollo**

En las figuras 6.1, 6.2, 6.3 y 6.4 se muestra el aspecto general que presentaban las plantas a lo largo del tiempo. En ellas se observa el efecto de la sequía y del CO<sub>2</sub> así como la recuperación hídrica.



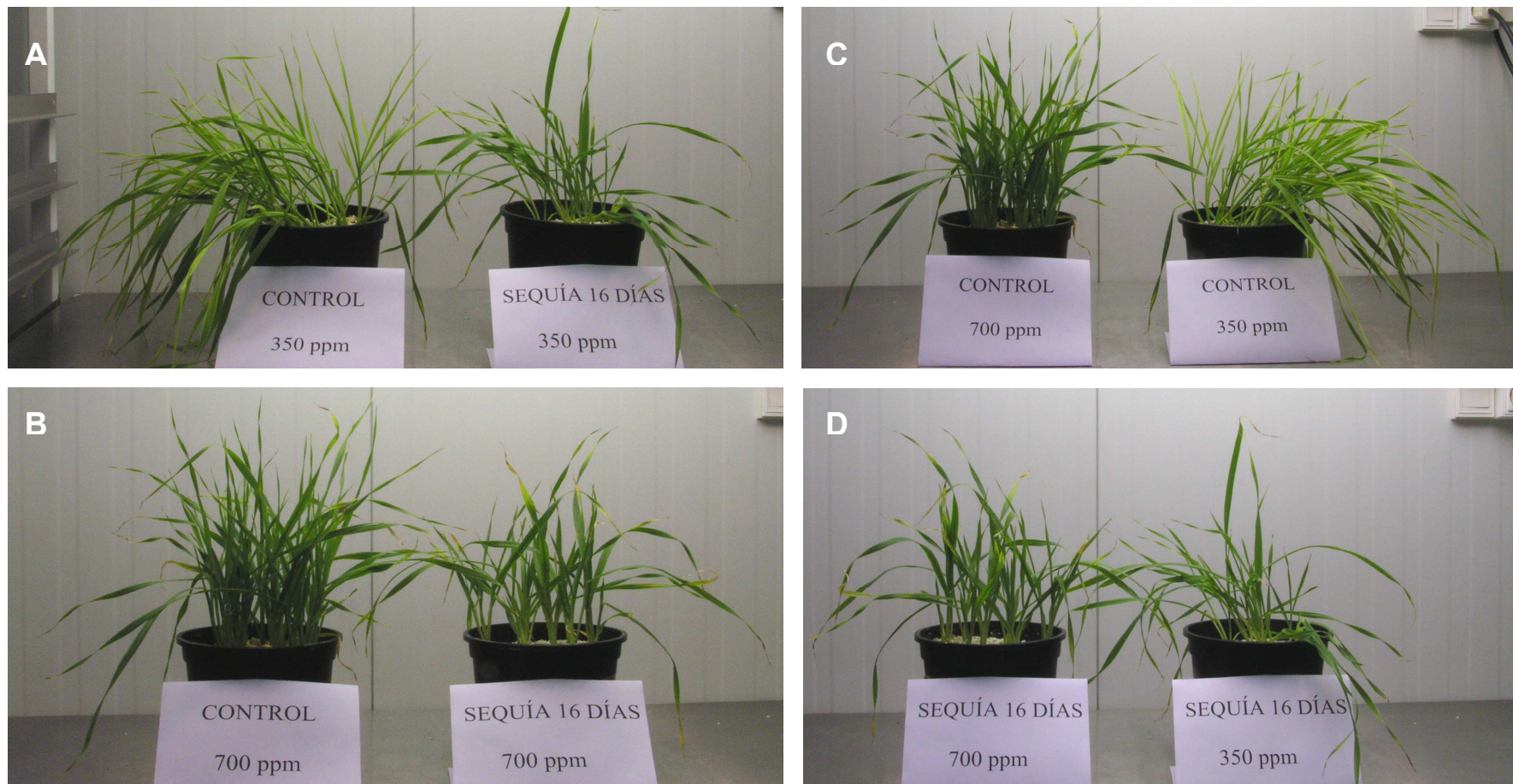
**Fig. 6.1.** Aspecto morfológico de la parte aérea de *Hordeum vulgare* L. cv. Iranis tras 9 días de estudio. **A)** Efecto de la sequía bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental. **B)** Efecto de la sequía bajo elevada [CO<sub>2</sub>]. **C)** Efecto de la [CO<sub>2</sub>] en plantas regadas y **D)** Efecto de la [CO<sub>2</sub>] en plantas sometidas a sequía.



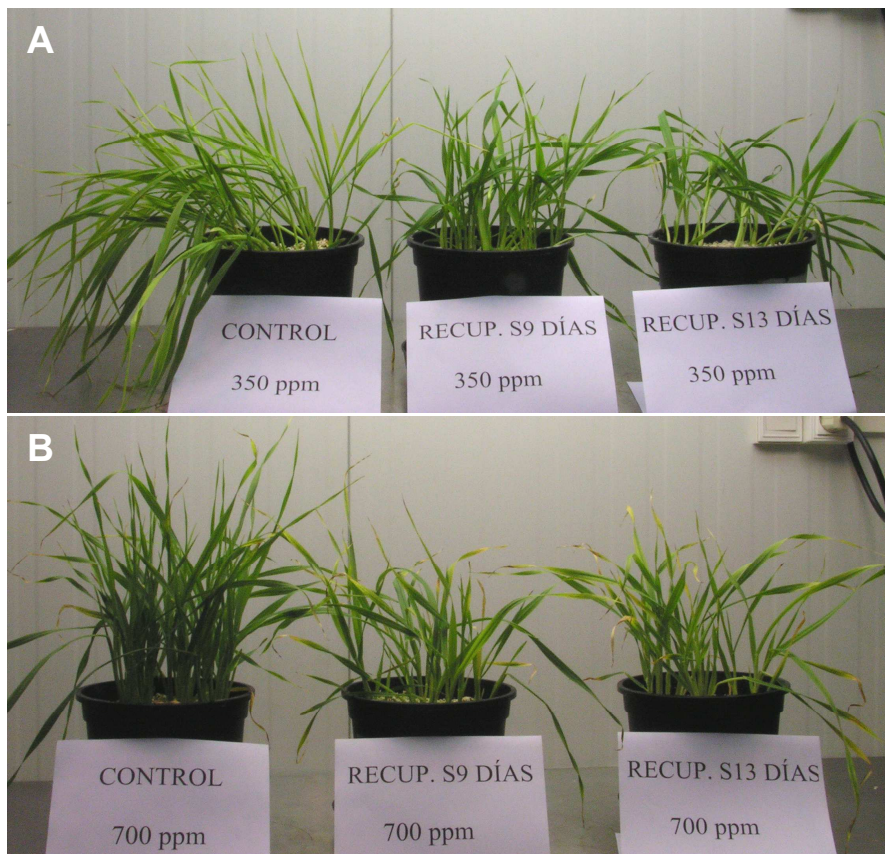


**Fig. 6.2.** Aspecto morfológico de la parte aérea de *Hordeum vulgare* L. cv. Iranis tras 13 días de estudio. **A)** Efecto de la sequía bajo  $[CO_2]$  ambiental. **B)** Efecto de la sequía bajo elevada  $[CO_2]$ . **C)** Efecto de la  $[CO_2]$  en plantas regadas y **D)** Efecto de la  $[CO_2]$  en plantas sometidas a sequía.





**Fig. 6.3.** Aspecto morfológico de la parte aérea de *Hordeum vulgare* L. cv. Iranis tras 16 días de estudio. **A)** Efecto de la sequía bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental. **B)** Efecto de la sequía bajo elevada [CO<sub>2</sub>]. **C)** Efecto de la [CO<sub>2</sub>] en plantas regadas y **D)** Efecto de la [CO<sub>2</sub>] en plantas sometidas a sequía.

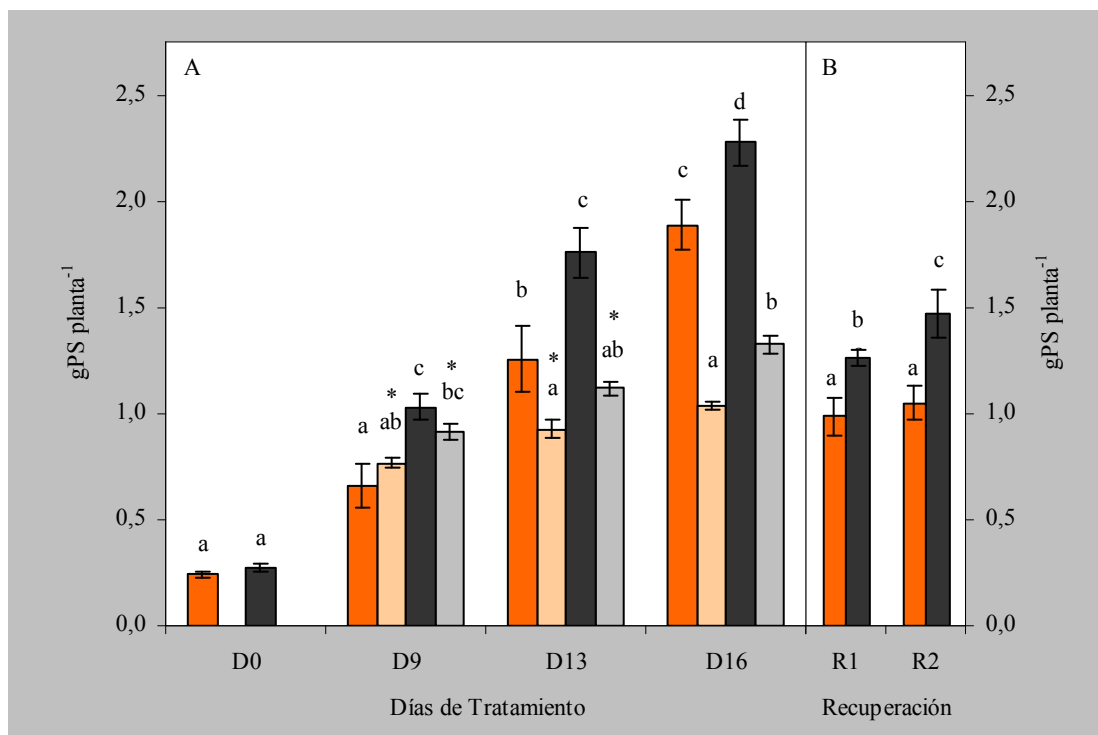


**Fig. 6.4.** Aspecto morfológico de la parte aérea de *Hordeum vulgare* L. cv. Iranis tras 16 días de estudio. **A)** Plantas control, plantas rehidratadas durante 7 días tras 9 días en sequía (RECUP. S9 DÍAS) y plantas rehidratadas durante 3 días tras 13 días en sequía (RECUP. S13 DÍAS) bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental. **B)** Plantas control, plantas rehidratadas durante 7 días tras 9 días en sequía (RECUP. S9 DÍAS) y plantas rehidratadas durante 3 días tras 13 días en sequía (RECUP. S13 DÍAS) bajo elevada [CO<sub>2</sub>].

### 6.2.2. Parámetros absolutos

El peso seco total expresado en gramos por planta (Fig. 6.5) se vio significativamente influenciado tanto por la [CO<sub>2</sub>] ( $P \leq 0,001$ ), como por la sequía ( $P \leq 0,001$ ), así como por el tiempo de exposición al tratamiento ( $P \leq 0,001$ ). También interaccionaron significativamente los factores: CO<sub>2</sub> con el tiempo de exposición al tratamiento ( $P \leq 0,001$ ), CO<sub>2</sub> con sequía ( $P \leq 0,05$ ), y el tiempo de exposición al tratamiento con sequía ( $P \leq 0,001$ ).





| Parámetro     | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|---------------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| Biomasa total | ***             | ***                 | ***    | ***                                   | *                        | ***                          | n.s.   |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento

**Fig. 6.5.** Interacción a lo largo del tiempo entre la sequía y el elevado CO<sub>2</sub> sobre la biomasa total por planta. **A)** D0 representa las plantas bien regadas al inicio del estudio: [CO<sub>2</sub>] ambiental (barras naranjas) y [CO<sub>2</sub>] elevada (barras grises); D9, D13 y D16 representan los días 9, 13 y 16, respectivamente, donde se mantienen plantas regadas (barras oscuras) y en sequía (barras claras). **B)** R1 y R2 representan las recuperaciones hídricas de las sequías S9 y S13, respectivamente, en el D16. Los valores son la media ± ES de al menos tres experimentos independientes, repetido cada uno de ellos tres veces. Dentro del mismo día de medida, las diferentes letras representan diferencias significativas a un nivel de  $P \leq 0,05$ . Dentro del mismo día de medida y para igual tratamiento hídrico el \* indica diferencias significativas a  $P \leq 0,05$  entre los tratamientos de CO<sub>2</sub>.

Cuando las plantas crecieron con buena disponibilidad hídrica y elevada [CO<sub>2</sub>], presentaron un 12% más de biomasa total al comienzo del ensayo que las plantas creciendo bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental. Esta diferencia fue mayor a medida que avanzaba el estudio, llegando a presentar valores de biomasa total en plantas regadas, un 36%, 29% y 17% mayores tras 9, 13 y 16 días de experimento, respectivamente (Fig. 6.5A).

Por otro lado, bajo condiciones de déficit hídrico obtuvimos descensos en biomasa total del 10%, 26% y 45% en las plantas de D9, D13 y D16, respectivamente,

creciendo a elevada [CO<sub>2</sub>] y disminuciones del 36% y 42%, para los tratamientos D13 y D16, respectivamente, bajo condiciones de [CO<sub>2</sub>] ambiental (Fig. 6.5A).

En el caso de plantas bajo restricción hídrica, también observamos valores superiores en plantas crecidas a elevada [CO<sub>2</sub>] respecto a las crecidas bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental. De este modo, las plantas de sequía de los tratamientos D9, D13 y D16 mostraron unos valores de biomasa total un 16%, 18% y 22%, respectivamente, superiores a elevada [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental (Fig. 6.5A).

El restablecimiento del riego (Fig. 6.5B) aumentó ligeramente la biomasa total tras 7 y 3 días de riego de las plantas S9 y S13, respectivamente, tanto a elevada [CO<sub>2</sub>] (R1, 39%; R2, 31%) como a [CO<sub>2</sub>] ambiental (R1, 29%; R2, 13%), de manera que no alcanzaron valores similares al control pero tendieron hacia ellos. En el caso de R1 representó el 56% de su respectivo control D16 bajo elevada [CO<sub>2</sub>] y un 52 % bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental. Respecto a las plantas del tratamiento R2 llegaron hasta un 65% y un 55% de sus plantas control D16 bajo elevada [CO<sub>2</sub>] y [CO<sub>2</sub>] ambiental, respectivamente (Fig. 6.5B).

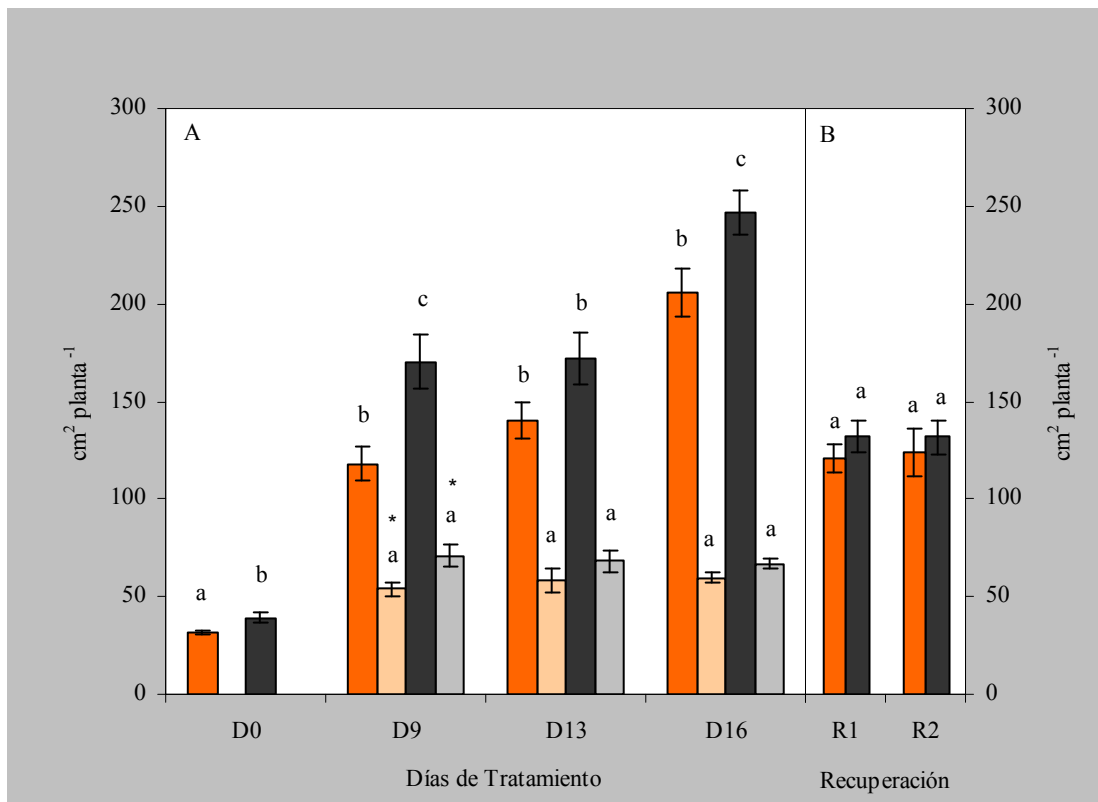
La respuesta del crecimiento total tras la recuperación fue de distinta magnitud dependiendo de la [CO<sub>2</sub>] a la que crecieron, siendo las plantas de R1 y R2 un 22% y un 29% mayor a elevada [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental (Fig. 6.5B).

La concentración de CO<sub>2</sub> a la que crecían las plantas tuvo un efecto significativo sobre el área de la parte aérea ( $P \leq 0,001$ ), así como la sequía ( $P \leq 0,001$ ) y las interacciones de CO<sub>2</sub> con el tiempo de exposición al tratamiento ( $P \leq 0,05$ ), CO<sub>2</sub> con sequía ( $P \leq 0,001$ ) y el tiempo de exposición al tratamiento con sequía ( $P \leq 0,001$ ) (Fig. 6.6).

La [CO<sub>2</sub>] afectó al área de la parte aérea de modo que se obtuvieron mayores valores en plantas creciendo a elevada [CO<sub>2</sub>] desde el comienzo del experimento. Analizando estas diferencias, en plantas regadas, se observó un 22%, 44%, 23% y 19% más área de la parte aérea a elevada [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental en los tratamientos D0, D9, D13 y D16, respectivamente (Fig. 6.6A).

La mayor producción de área de la parte aérea (Fig. 6.6) correspondió a las plantas óptimamente regadas y disminuyó drásticamente con la sequía. Así, cuando las plantas se sometieron a sequía (Fig. 6.6A) se observaron descensos, respecto a las plantas regadas, del 54%, 59% y 71% tras 9, 13 y 16 días, respectivamente, a [CO<sub>2</sub>] ambiental y cuando las plantas crecieron en condiciones de elevada [CO<sub>2</sub>] los descensos

provocados por la sequía fueron del 58%, 60% y 73% tras 9, 13 y 16 días, respectivamente.



| Parámetro              | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|------------------------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| Área de la parte aérea | ***             | ***                 | ***    | *                                     | ***                      | ***                          | n.s.   |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo  
<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento

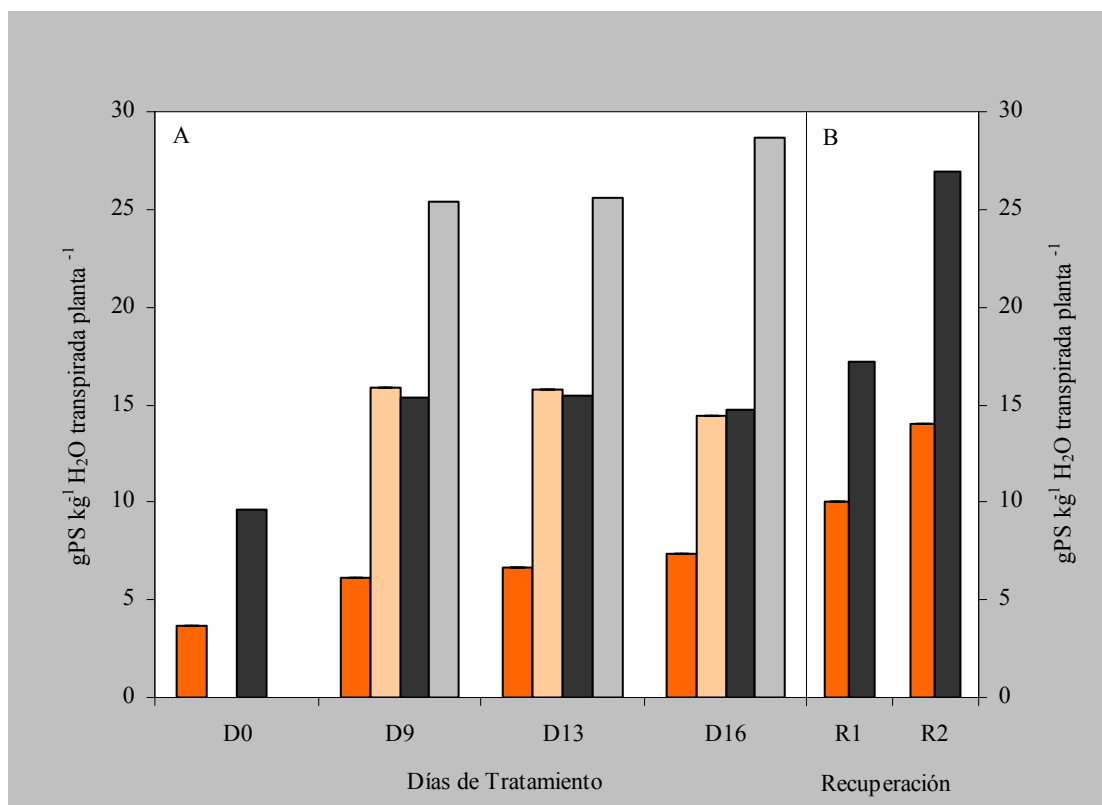
**Fig. 6.6** Interacción a lo largo del tiempo entre la sequía y el elevado CO<sub>2</sub> sobre el área de la parte aérea. Condiciones de crecimiento y análisis estadístico como en Fig. 6.5.

La [CO<sub>2</sub>] también afectó a las plantas sometidas a sequía (Fig. 6.6A) de forma que las plantas creciendo a elevada [CO<sub>2</sub>] mostraron un 31%, 17% y 12% más de área de la parte aérea que las plantas crecidas a [CO<sub>2</sub>] ambiental, para los tratamientos de sequía D9, D13 y D16, respectivamente.

Cuando se restableció el riego en los tratamientos de sequía se pudo observar que la [CO<sub>2</sub>] elevada produjo mayor aumento de área de la parte aérea que la [CO<sub>2</sub>] ambiental, de modo que R1 y R2 fueron un 9% y un 6% mayores a [CO<sub>2</sub>] elevada que a [CO<sub>2</sub>] ambiental, respectivamente (Fig. 6.6B). Las plantas de los tratamientos R1 y R2 alcanzaron un área de la parte aérea, respecto a su control D16, del 60% bajo condiciones de [CO<sub>2</sub>] ambiental. Por otro lado, en condiciones de elevada [CO<sub>2</sub>], las

plantas de los tratamientos R1 y R2 llegaron hasta un 54% de su respectivo control D16. El porcentaje de recuperación de las plantas que se sometieron primero a 9 días de sequía (R1) fue del 124% y 86% en  $[\text{CO}_2]$  ambiental y elevada  $[\text{CO}_2]$ , respectivamente. La recuperación que experimentaron las plantas que permanecieron 13 días en sequía (R2) fue del 112% y 93%, en condiciones de  $[\text{CO}_2]$  ambiental y elevada  $[\text{CO}_2]$ , respectivamente (Fig. 6.6B).

La eficiencia en el uso del agua (*EUA*) es un parámetro que relaciona la ganancia en peso de la planta en relación al agua consumida durante el mismo periodo de crecimiento. La *EUA* (Fig. 6.7) se vio marcadamente afectada por la  $[\text{CO}_2]$  ( $P \leq 0,001$ ). En plantas regadas, la *EUA* permaneció prácticamente constante a partir del día 9 del experimento. El elevado  $\text{CO}_2$  causó, sin embargo, un incremento medio del 136% en la *EUA* de plantas regadas comparando con las plantas crecidas y regadas bajo  $[\text{CO}_2]$  ambiental en el mismo periodo de tiempo.



| Parámetro  | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|------------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| <i>EUA</i> | ***             | ***                 | ***    | n.s.                                  | n.s.                     | n.s.                         | n.s.   |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo

<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento.

**Fig. 6.7.** Interacción a lo largo del tiempo entre la sequía y el elevado  $\text{CO}_2$  sobre la eficiencia en el uso del agua por planta entera (*EUA*). Condiciones de crecimiento como en Fig. 6.5.

Después de 16 días en sequía ( $P \leq 0,001$ ), la *EUA* se incrementó un 95% bajo ambas  $[CO_2]$ . A pesar de esta similitud, la *EUA* dependió de la  $[CO_2]$  ya que las plantas en sequía presentaron mayores *EUA* cuando crecían a elevada  $[CO_2]$  que a  $[CO_2]$  ambiental. Esto es un 61%, 62% y 98% para D9, D13 y D16, respectivamente.

Al restablecer el riego, las plantas de los tratamientos de R1 y R2 (Fig. 6.7B) presentaron valores de *EUA* aún superiores que los de sus respectivos controles del D16 bajo ambas  $[CO_2]$ . Las plantas del tratamiento R1 mostraron valores de *EUA* inferiores a los de plantas que estuvieron en sequía durante 9 días bajo ambas  $[CO_2]$ . Las plantas del tratamiento R2 mostraron valores de *EUA* similares a los de las mismas plantas tras haber estado 13 días en sequía, bajo ambas  $[CO_2]$ . De este modo mantuvieron una elevada *EUA*. En cualquier caso, tanto las plantas de R1 (72%) como las del tratamiento R2 (91%) presentaron mayor *EUA* a elevada  $[CO_2]$  que a  $[CO_2]$  ambiental.

En la Tabla 6.1 se representa tanto el número de hojas como el reparto de biomasa entre la parte aérea y la radical en función de los diversos tratamientos. El número de hojas se vio afectado significativamente por la  $[CO_2]$  ( $P \leq 0,001$ ), por la sequía ( $P \leq 0,001$ ) y por el tiempo de exposición al tratamiento de las plantas ( $P \leq 0,001$ ). También resultaron estadísticamente significativas las interacciones entre  $[CO_2]$  y sequía ( $P \leq 0,001$ ),  $[CO_2]$  y el tiempo de exposición al tratamiento ( $P \leq 0,001$ ), así como entre sequía y el tiempo de exposición al tratamiento ( $P \leq 0,001$ ).

Durante todo el estudio se obtuvo un mayor número de hojas en plantas creciendo a elevada  $[CO_2]$  que a  $[CO_2]$  ambiental, independientemente del régimen hídrico. Así, cuando las plantas estaban regadas y además crecían a elevada  $[CO_2]$  contenían un 27%, 44%, 31% y 30% mayor número de hojas que a  $[CO_2]$  ambiental en los días 0, 9, 13 y 16, respectivamente.

Por otro lado, las plantas en sequía presentaron menor número de hojas que las plantas regadas. La diferencia para los tratamientos de D9, D13 y D16 fue de un 45%, 46% y 64% menor número de hojas, respectivamente, en plantas de sequía que en plantas regadas en condiciones de  $[CO_2]$  ambiental. Cuando las plantas crecieron a elevada  $[CO_2]$  las diferencias para los mismos tratamientos fueron del 46%, 51% y 63% menos hojas en sequía que en riego. Por lo tanto el efecto de la sequía fue similar bajo ambas  $[CO_2]$  (Tabla 6.1).

Para las plantas que crecían en condiciones de elevada  $[CO_2]$  pero en sequía, también se observaron porcentajes mayores en el número de hojas que en plantas

creciendo a [CO<sub>2</sub>] ambiental y restricción hídrica. Estos porcentajes fueron un 43%, 19% y un 34% para las sequías de D9, D13 y D16, respectivamente (Tabla 6.1).

Tras el periodo de restablecimiento del riego se observó mayor cantidad de hojas a elevada [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental (Tabla 6.1). Para las plantas de los tratamientos R1 y R2 el número de hojas fue un 31% y 17% mayor a elevada [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental, respectivamente. Las plantas de los tratamientos R1 y R2 incrementaron su número de hojas, hasta que alcanzaron valores que fueron 75% y 66% de su control D16, respectivamente, bajo condiciones de [CO<sub>2</sub>] ambiental. Por otro lado, en condiciones de elevada [CO<sub>2</sub>], las plantas de R1 y R2 llegaron a un 76% y un 59%, respectivamente, de su control D16. El porcentaje de recuperación de las plantas que se sometieron primero a 9 días de sequía (R1) fue del 143% y 123% en [CO<sub>2</sub>] ambiental y elevada [CO<sub>2</sub>], respectivamente. La recuperación que experimentaron las plantas que permanecieron 13 días en sequía (R2) fue del 75-77% bajo ambas [CO<sub>2</sub>] (Tabla 6.1).

En cuanto a la producción de biomasa aérea observamos que la [CO<sub>2</sub>] ejerció un efecto significativo ( $P \leq 0,001$ ), así como el tiempo de exposición al tratamiento ( $P \leq 0,001$ ), la sequía ( $P \leq 0,001$ ) y las interacciones de los factores CO<sub>2</sub> con el tiempo de exposición al tratamiento ( $P \leq 0,001$ ), el CO<sub>2</sub> con la sequía ( $P \leq 0,001$ ) y el tiempo de exposición al tratamiento con la sequía ( $P \leq 0,001$ ) (Tabla 6.1).

Desde el comienzo del estudio la biomasa aérea fue superior a elevada [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental, siendo un 21%, 65%, 39% y 38% superior en los días D0, D9, D13 y D16, respectivamente, en condiciones de riego (Tabla 6.1).

**Tabla 6.1.** Número de hojas por planta, biomasa parte aérea (gPS vástago) y biomasa parte radical (gPS raíz). Los valores son la media  $\pm$  ES de al menos tres experimentos independientes, repetido cada uno de ellos tres veces. Dentro del mismo día de medida, las diferentes letras representan diferencias significativas a un nivel de  $P \leq 0,05$ .

| Días Riego | N° hojas         |                    | gPS vástago        |                     | gPS raíz            |                      |                      |
|------------|------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
|            | 350              | 700                | 350                | 700                 | 350                 | 700                  |                      |
| <b>0</b> C | 4,1 $\pm$ 0,20 a | 5,2 $\pm$ 0,20 b   | 0,109 $\pm$ 0,01 a | 0,132 $\pm$ 0,01 b  | 0,132 $\pm$ 0,02 a  | 0,145 $\pm$ 0,01 a   |                      |
| <b>9</b>   | C                | 11,5 $\pm$ 1,00 b  | 16,6 $\pm$ 1,00 c  | 0,420 $\pm$ 0,03 b  | 0,737 $\pm$ 0,07 c  | 0,237 $\pm$ 0,02 a   | 0,293 $\pm$ 0,02 a   |
|            | S                | 6,3 $\pm$ 0,30 a   | 9 $\pm$ 0,60 b     | 0,241 $\pm$ 0,02 a  | 0,325 $\pm$ 0,03 ab | 0,524 $\pm$ 0,01 b   | 0,587 $\pm$ 0,02 b   |
| <b>13</b>  | C                | 13,9 $\pm$ 1,00 b  | 18,2 $\pm$ 1,20 c  | 0,546 $\pm$ 0,02 b  | 0,760 $\pm$ 0,06 c  | 0,710 $\pm$ 0,15 a   | 0,997 $\pm$ 0,14 b   |
|            | S                | 7,5 $\pm$ 0,50 a   | 8,9 $\pm$ 0,50 a   | 0,262 $\pm$ 0,02 a  | 0,356 $\pm$ 0,03 a  | 0,662 $\pm$ 0,03 c   | 0,764 $\pm$ 0,00 a   |
| <b>16</b>  | C                | 20,3 $\pm$ 1,00 d  | 26,4 $\pm$ 0,80 e  | 0,860 $\pm$ 0,06 d  | 1,183 $\pm$ 0,06 e  | 1,026 $\pm$ 0,14 c   | 1,092 $\pm$ 0,12 c   |
|            | S                | 7,3 $\pm$ 0,40 a   | 9,8 $\pm$ 0,40 ab  | 0,302 $\pm$ 0,02 a  | 0,418 $\pm$ 0,02 ab | 0,737 $\pm$ 0,01 abc | 0,907 $\pm$ 0,04 bc  |
|            | R1               | 15,3 $\pm$ 0,80 cd | 20,1 $\pm$ 1,20 d  | 0,506 $\pm$ 0,02 bc | 0,657 $\pm$ 0,04 c  | 0,479 $\pm$ 0,08 a   | 0,609 $\pm$ 0,04 ab  |
|            | R2               | 13,3 $\pm$ 1,60 bc | 15,6 $\pm$ 0,70 cd | 0,563 $\pm$ 0,03 bc | 0,663 $\pm$ 0,05 c  | 0,483 $\pm$ 0,10 ab  | 0,808 $\pm$ 0,12 abc |

| Parámetro           | CO <sub>2</sub> | T.e.t. <sup>1</sup> | Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> | CO <sub>2</sub> x Sequía | T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía | CO <sub>2</sub> x T.e.t. <sup>1</sup> x Sequía |
|---------------------|-----------------|---------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--|
| N° hojas            | ***             | ***                 | ***    | ***                                   | ***                      | ***                          | n.s.   |
| Biomasa del vástago | ***             | ***                 | ***    | ***                                   | ***                      | ***                          | n.s.   |
| Biomasa raíz        | **              | ***                 | n.s.   | n.s.                                  | n.s.                     | ***                          | n.s.   |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo

<sup>1</sup> T.e.t. es el Tiempo de exposición al tratamiento.

Las plantas en sequía presentaron un 43%, 52% y un 65% menos biomasa del vástago que las regadas en los tratamientos de D9, D13 y D16, respectivamente, a [CO<sub>2</sub>] ambiental. La disminución de biomasa aérea en plantas de sequía creciendo a elevada [CO<sub>2</sub>] fue del 56%, 53% y 65%, respecto a sus plantas regadas, en los tratamientos de D9, D13 y D16, respectivamente. El efecto de la sequía bajo ambas [CO<sub>2</sub>] fue similar (Tabla 6.1).

En los tratamientos de sequía se observaron valores un 35%, 36% y 38% superiores a elevada [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental en los días D9, D13 y D16, respectivamente.

Además, tras el riego, las plantas que habían estado en sequía y crecidas a elevada [CO<sub>2</sub>] mostraron un 30% y un 18% más de biomasa en los tratamientos R1 y R2, respectivamente, que las que habían crecido bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental y en sequía (Tabla 6.1). Las plantas de los tratamientos R1 y R2 alcanzaron una biomasa del vástago, respecto a su control D16, del 59% y 65%, respectivamente, bajo condiciones de [CO<sub>2</sub>] ambiental. Por otro lado, en condiciones de elevada [CO<sub>2</sub>], las plantas de R1 y R2 llegaron hasta un 56% de su control D16. El porcentaje de recuperación de las plantas que se sometieron a 9 días de sequía, R1, fue del 110% y 102% en [CO<sub>2</sub>] ambiental y elevada [CO<sub>2</sub>], respectivamente. La recuperación que experimentaron las plantas que permanecieron 13 días en sequía, R2, fue del 115% y 86% bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental y elevada [CO<sub>2</sub>], respectivamente (Tabla 6.1).

Cuando analizamos la producción de biomasa radical (Tabla 6.1) vimos que hubo un efecto significativo de la [CO<sub>2</sub>] ( $P \leq 0,01$ ) y del tiempo de exposición al tratamiento ( $P \leq 0,001$ ), habiéndose encontrado una interacción estadísticamente significativa entre la sequía y el tiempo de exposición al tratamiento ( $P \leq 0,001$ ).

Bajo elevada [CO<sub>2</sub>] y condiciones de riego las plantas presentaron mayor biomasa radical, esto es, un 10%, 24%, 40% y 6% a elevada [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental, para los tratamientos en riego de D0, D9, D13 y D16, respectivamente.

Como se puede observar en la Tabla 6.1 las plantas tras 9 días de sequía invierten gran cantidad de energía en acumular biomasa radical para captar el agua residual del sustrato de manera que presentan más biomasa radical que las plantas regadas de su misma edad (D9), un 121% y un 100% más en las plantas de [CO<sub>2</sub>] ambiental y de elevada [CO<sub>2</sub>], respectivamente. A partir del día 9 del experimento, la falta de agua afecta negativamente a la producción de biomasa radical y la producción neta siempre es menor que en plantas regadas. De este modo, en los tratamientos D13 y



D16 se observan descensos del 7% y 28%, respectivamente, comparando con las plantas regadas de su misma edad y  $[\text{CO}_2]$  ambiental, y del 23% y 17%, respectivamente, a elevada  $[\text{CO}_2]$ .

En cualquiera de los tratamientos hídricos se puede comprobar que el aumento de  $\text{CO}_2$  estimula la producción de biomasa radical (Tabla 6.1) ya que el  $\text{CO}_2$  también estimuló más el crecimiento de las raíces en plantas sometidas a sequía, un 12%, 15% y un 23% en los tratamientos D9, D13 y D16, respectivamente, comparado con las de  $[\text{CO}_2]$  ambiental.

Esta estimulación por el  $\text{CO}_2$  también se observó en las plantas en las que se restableció el riego. Para las plantas de los tratamientos R1 y R2 obtuvimos un 27% y un 67% más biomasa radical, respectivamente, a elevada  $[\text{CO}_2]$  que a  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Las plantas de los tratamientos R1 y R2 alcanzaron una biomasa radical, respecto a su control D16, del 47% bajo condiciones de  $[\text{CO}_2]$  ambiental por lo que no se recuperó, ya que aunque se restableció el riego el peso seco de las raíces no aumentó. Por otro lado, en condiciones de elevada  $[\text{CO}_2]$ , las plantas de R1 y R2 llegaron hasta un 56% y un 74%, respectivamente, de su control D16. El porcentaje de recuperación de las plantas del tratamiento R1 respecto a estas mismas plantas cuando estaban en sequía (S9) fue del 4% y la recuperación de las plantas del tratamiento R2, respecto a las mismas plantas cuando estaban en sequía (S13) fue del 6% bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  (Tabla 6.1).

**Tabla 6.2.** Cociente raíz:parte aérea (R/A) en función del peso seco de ambas partes.

| Días | Control |        | Sequía |        |
|------|---------|--------|--------|--------|
|      | 350ppm  | 700ppm | 350ppm | 700ppm |
| 0    | 1,21    | 1,10   | 1,21   | 1,10   |
| 9    | 0,56    | 0,40   | 2,17   | 1,81   |
| 13   | 1,30    | 1,31   | 2,53   | 2,15   |
| 16   | 1,19    | 0,92   | 2,44   | 2,17   |

En el caso de las plantas que crecieron a elevada  $[\text{CO}_2]$  y buena disponibilidad hídrica se observó un cociente R/A similar o ligeramente inferior al de plantas regadas y crecidas bajo  $[\text{CO}_2]$  ambiental (Tabla 6.2).

La sequía produjo un aumento significativo del cociente R/A en las plantas los días D9, D13 y D16 respecto a las plantas regadas, concretamente un 287%, 95% y 105%, respectivamente, bajo  $[\text{CO}_2]$  ambiental (Tabla 6.2) y en condiciones de elevada

[CO<sub>2</sub>] también presentaron cocientes R/A superiores a los de sus controles, siendo de un 352%, 64% y 136%, en los días D9, D13 y D16, respectivamente (Tabla 6.2).

Si analizamos el cociente R/A de las plantas crecidas bajo elevada [CO<sub>2</sub>] y sequía respecto a las plantas crecidas en sequía y [CO<sub>2</sub>] ambiental se observó que los cocientes fueron inferiores bajo elevada [CO<sub>2</sub>], esto es un 17%, un 15% y un 11% inferiores para las sequías de los días D9, D13 y D16, respectivamente (Tabla 6.2).

### 6.2.3. Parámetros relativos

A partir de los resultados de parámetros absolutos analizamos el resultado de tasa de producción de biomasa, RGR total, el RGR del vástago y el RGR de la raíz desde el comienzo hasta el final del estudio (Tabla 6.3). El RGR se expresa como el incremento de materia seca por día y en función de la materia seca de partida. A su vez, esta tasa depende de los componentes funcional y morfológico de la planta, NAR y LAR, respectivamente (Tabla 6.4).

No se observó efecto significativo de la [CO<sub>2</sub>] sobre el RGR total, RGR del vástago y RGR raíz a pesar de que plantas regadas y crecidas a elevada [CO<sub>2</sub>] presentaron un 3% más de tasa RGR total que las plantas regadas y crecidas bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental (Tabla 6.3).

La sequía causó un efecto significativo ( $P \leq 0,001$ ) sobre el RGR total y RGR del vástago (Tabla 6.3). Cuando las plantas crecieron con buena disponibilidad hídrica presentaron mayor RGR total y RGR del vástago que las plantas en sequía. Observamos que se produjo un descenso del 29% y del 26% respecto a sus plantas regadas en el RGR total tras 16 días de sequía creciendo bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental y elevada [CO<sub>2</sub>], respectivamente y un descenso del 44-46% en las mismas condiciones en el RGR del vástago bajo ambas [CO<sub>2</sub>] (Tabla 6.3). En los resultados que obtuvimos para el RGR de la raíz no se observaron efectos significativos de la sequía. En condiciones de elevada [CO<sub>2</sub>] en el D16 tanto las plantas regadas como las de sequía muestran la misma tasa de crecimiento de la raíz. En los tratamientos de sequía de D16 el RGR raíz fue un 7% mayor que el RGR radical de las plantas regadas en condiciones de [CO<sub>2</sub>] ambiental. Bajo elevada [CO<sub>2</sub>] el RGR de la raíz de plantas en riego y de plantas en sequía fue similar.

No se observaron diferencias significativas entre el RGR del vástago de plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$  o  $[\text{CO}_2]$  ambiental en sequía (Tabla 6.3). En condiciones de elevada  $[\text{CO}_2]$  y sequía el RGR de la raíz fue un 9% inferior que en plantas en sequía y  $[\text{CO}_2]$  ambiental.

Al restablecer el riego observamos que el RGR total de las plantas de los tratamientos de recuperación, R1 y R2, fue un 8% y un 15% mayor, respectivamente, en condiciones de elevada  $[\text{CO}_2]$  que de  $[\text{CO}_2]$  ambiental aunque estas diferencias no fueron significativas. Bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  los valores de RGR total de R1 y R2 alcanzaron respectivamente un 72% y 79% de su valor control del mismo día, D16. En condiciones de  $[\text{CO}_2]$  ambiental el RGR total de R1 y R2 mostraron respectivamente un 69% y 71% de su valor control en el D16 (Tabla 6.3). Por otro lado, bajo ambas  $[\text{CO}_2]$ , el RGR del vástago tras el riego mostró valores cercanos, aunque todavía inferiores, a los valores control regados en el D16 (Tabla 6.3). En condiciones de  $[\text{CO}_2]$  ambiental, los valores de RGR del vástago de R1 y R2 mostraron valores del 81% y 88%, respectivamente, de su control del D16 y bajo elevada  $[\text{CO}_2]$ , R1 y R2 alcanzaron un 77% y 68%, respectivamente, del valor de las plantas control del D16 (Tabla 6.3). Cabe destacar también que las recuperaciones de RGR del vástago a elevada  $[\text{CO}_2]$  fueron inferiores que a  $[\text{CO}_2]$  ambiental, un 7% y un 24%, para R1 y R2, respectivamente. Respecto al RGR raíz, tras el riego, se observó que las plantas de los tratamientos R1 y R2 bajo  $[\text{CO}_2]$  ambiental mostraron valores respecto a su control D16 del 71% y 92%, respectivamente. En condiciones de elevada  $[\text{CO}_2]$  los valores de RGR raíz de R1 y R2 mostraron datos del 86% y 88% de su control en el D16, respectivamente (Tabla 6.3). Las plantas del tratamiento R1 y elevada  $[\text{CO}_2]$  presentaron un RGR raíz superior, 19%, que las plantas de  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Por el contrario, R2 presentó un 6% menos de RGR radical en plantas de elevada  $[\text{CO}_2]$  que en plantas de  $[\text{CO}_2]$  ambiental.

**Tabla 6.3.** Tasa de crecimiento relativo total (RGR total, g PS g<sup>-1</sup> PS día<sup>-1</sup>), tasa de crecimiento relativo de la parte aérea (RGR del vástago, g PS g<sup>-1</sup> PS día<sup>-1</sup>) y tasa de crecimiento relativo de la raíz (RGR raíz, g PS g<sup>-1</sup> PS día<sup>-1</sup>) al final del experimento, día D16. Los valores son la media ± ES de al menos tres experimentos independientes, repetido cada uno de ellos tres veces. Dentro del mismo día de medida, las diferentes letras representan diferencias significativas a un nivel de  $P \leq 0,05$ .

| Días | Riego | RGR total       |                 | RGR del vástago  |                 | RGR raíz       |                |
|------|-------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|----------------|----------------|
|      |       | 350             | 700             | 350              | 700             | 350            | 700            |
| 16   | C     | 0,128 ± 0,00 bc | 0,132 ± 0,01 c  | 0,129 ± 0,00 e   | 0,128 ± 0,00 de | 0,110 ± 0,01 a | 0,108 ± 0,01 a |
|      | S     | 0,091 ± 0,01 a  | 0,098 ± 0,00 a  | 0,070 ± 0,00 a   | 0,072 ± 0,00 a  | 0,118 ± 0,01 a | 0,107 ± 0,00 a |
|      | R1    | 0,088 ± 0,00 a  | 0,095 ± 0,00 a  | 0,105 ± 0,00 bcd | 0,098 ± 0,00 cd | 0,078 ± 0,01 a | 0,093 ± 0,01 a |
|      | R2    | 0,091 ± 0,01 a  | 0,105 ± 0,00 ab | 0,114 ± 0,01 cde | 0,087 ± 0,00 ab | 0,101 ± 0,01 a | 0,095 ± 0,01 a |

| Parámetro       | CO <sub>2</sub> | Sequía | CO <sub>2</sub> x Sequía |
|-----------------|-----------------|--------|--------------------------|
| RGR total       | n.s.            | ***    | n.s.                     |
| RGR del vástago | n.s.            | ***    | n.s.                     |
| RGR raíz        | n.s.            | n.s.   | n.s.                     |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo

Al analizar el efecto del CO<sub>2</sub> sobre los componentes NAR y LAR del RGR total se puede deducir que el componente funcional, NAR y el morfológico, LAR (Tabla 6.4) muestran respuestas diferentes a la elevada [CO<sub>2</sub>]. En el caso de NAR, los tratamientos presentan mayores valores a elevada [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental, independientemente del régimen hídrico aunque las diferencias no fueron significativas (Tabla 6.4)

La sequía afectó significativamente al NAR ( $P \leq 0,05$ ) (Tabla 6.4). Las plantas de 16 días en sequía presentaron un NAR ligeramente superior, 2%, al de plantas regadas en condiciones de [CO<sub>2</sub>] ambiental. Bajo elevada [CO<sub>2</sub>], las plantas de 16 días en sequía mostraron un NAR un 14% superior respecto al de plantas regadas en el D16 (Tabla 6.4). En el caso de plantas en sequía vimos diferencias en el NAR dependiendo de la [CO<sub>2</sub>] a la que crecían ya que las plantas crecidas bajo elevada [CO<sub>2</sub>] presentaron un NAR superior que las plantas en sequía de [CO<sub>2</sub>] ambiental, esto es, un 13 %.

Los valores de NAR en los tratamientos de recuperación mostraron una tendencia a igualar valores de plantas regadas bajo ambas [CO<sub>2</sub>]. En el caso de las plantas de los tratamientos de R1 y R2, alcanzaron el 63% y el 67%, respectivamente, del valor control de NAR en el D16 en condiciones de [CO<sub>2</sub>] ambiental. Estos datos de plantas de R1 y R2, bajo elevada [CO<sub>2</sub>] alcanzaron un 73% y 88%, respectivamente, del valor control del D16 (Tabla 6.4). Los datos de recuperación fueron superiores a elevada [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental en un 16% y un 32%, para R1 y R2, respectivamente (Tabla 6.4).

**Tabla 6.4.** Tasa de asimilación neta de la parte aérea (NAR, g PS m<sup>-2</sup> día<sup>-1</sup>) y relación de área parte aérea (LAR, m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup> PS). Los valores son la media ± ES de al menos tres experimentos independientes, repetido cada uno de ellos tres veces. Dentro del mismo día de medida, las diferentes letras representan diferencias significativas a un nivel de  $P \leq 0,05$ .

| Días | Riego | NAR             |                 | LAR             |                          |
|------|-------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
|      |       | 350             | 700             | 350             | 700                      |
| 16   | C     | 11,03 ± 1,02 bc | 11,09 ± 0,59 c  | 11,63 ± 1,34 bc | 11,89 ± 0,50 bc          |
|      | S     | 11,25 ± 0,48 c  | 12,69 ± 0,42 c  | 8,10 ± 0,16 a   | 7,72 ± 0,19 a            |
|      | R1    | 6,97 ± 0,15 a   | 8,10 ± 0,11 ab  | 12,59 ± 0,36 bc | 11,75 ± 0,32 bc          |
|      | R2    | 7,43 ± 0,42 a   | 9,80 ± 0,76 abc | 12,31 ± 1,89 c  | 10,68 ± 0,47 b           |
|      |       | Parámetro       | CO <sub>2</sub> | Sequía          | CO <sub>2</sub> x Sequía |
|      |       | NAR             | n.s.            | *               | n.s.                     |
|      |       | LAR             | n.s.            | *               | n.s.                     |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo

La  $[CO_2]$  no tuvo efecto significativo sobre el componente morfológico LAR (Tabla 6.4). Cuando las plantas crecieron en condiciones de riego no hubo diferencias significativas entre ambas  $[CO_2]$  (Tabla 6.4).

El parámetro LAR (Tabla 6.4) es indicativo de la relación entre el área de la parte aérea y el peso seco total de la planta. El efecto de la sequía sobre LAR fue negativo, estadísticamente significativo ( $P \leq 0,05$ ) (Tabla 6.4). Este descenso de LAR en plantas de sequía fue un 30% para D16 comparando con sus controles en riego y  $[CO_2]$  ambiental. En condiciones de elevada  $[CO_2]$  el descenso fue del 35% para las plantas de D16. Por tanto se observó que bajo elevada  $[CO_2]$  el efecto de la sequía fue ligeramente mayor.

Cuando las plantas crecieron en condiciones de elevada  $[CO_2]$  y sequía los valores de LAR fueron ligeramente inferiores que en plantas de sequía y  $[CO_2]$  ambiental (5%) aunque estas diferencias no fueron significativas (Tabla 6.4). Es decir, la caída del componente morfológico (LAR) contrarrestó el aumento del componente funcional (NAR) causado por la sequía lo que se tradujo en una disminución del RGR total (Tabla 6.3).

El efecto negativo que provoca la sequía sobre el LAR revirtió visiblemente cuando se restableció el régimen de riego. Como se puede deducir de los resultados expuestos en la Tabla 6.4, tanto R1 como R2 mostraron valores cercanos a las plantas regadas de D16 (elevada  $[CO_2]$ ) o, incluso, los sobrepasaron ( $[CO_2]$  ambiental) (Tabla 6.4). Las plantas del tratamiento R1 y elevada  $[CO_2]$  presentaron un LAR 7% inferior que las plantas bajo  $[CO_2]$  ambiental. Del mismo modo, las plantas de R2 y elevada  $[CO_2]$  también mostraron un LAR inferior, 13%, que las plantas bajo  $[CO_2]$  ambiental (Tabla 6.4).

El parámetro LAR se descompone en dos componentes: el área de la parte aérea específica, SLA, que es la relación entre el área y la biomasa seca del vástago, y la relación de peso del vástago, LWR, que es la relación de peso del vástago frente a la biomasa total (Tabla 6.5). El efecto de la  $[CO_2]$  sobre el SLA (Tabla 6.5) fue estadísticamente significativo ( $P \leq 0,001$ ). Cuando las plantas crecieron en condiciones de elevada  $[CO_2]$  y riego el SLA de éstas fue un 8% menor que el de plantas en riego bajo  $[CO_2]$  ambiental.

En nuestros resultados observamos que la sequía provocó un descenso no significativo en el SLA (Tabla 6.5). Como se puede observar, el SLA en plantas de sequía fue un 9% menor que el de plantas regadas el día D16 bajo  $[CO_2]$  ambiental. En

condiciones de elevada  $[\text{CO}_2]$  el área específica de la parte aérea también descendió respecto a las plantas control, un 11% el D16. Cuando las plantas crecieron en condiciones de elevada  $[\text{CO}_2]$  y sequía mostraron un SLA un 11% inferior que el de plantas en sequía bajo  $[\text{CO}_2]$  ambiental (Tabla 6.5).

El SLA de las plantas tras la recuperación hídrica mostró valores similares a los de plantas regadas en D16 bajo ambas  $[\text{CO}_2]$  (Tabla 6.5). En condiciones de elevada  $[\text{CO}_2]$  las plantas de los tratamientos R1 y R2 mostraron datos de SLA un 9% y un 5% inferiores, respectivamente, que las plantas creciendo bajo  $[\text{CO}_2]$  ambiental.

**Tabla 6.5.** Área específica de la parte aérea (SLA,  $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$  PS). Relación de peso del vástago (LWR, g PS  $\text{g}^{-1}$  PS). Los valores son la media  $\pm$  ES de al menos tres experimentos independientes, repetido cada uno de ellos tres veces. Dentro del mismo día de medida, las diferentes letras representan diferencias significativas a un nivel de  $P \leq 0,05$ .

| Días | Riego | SLA                 |                     | LWR                  |                      |
|------|-------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
|      |       | 350                 | 700                 | 350                  | 700                  |
| 16   | C     | 25,61 $\pm$ 0,40 b  | 23,50 $\pm$ 0,47 ab | 0,454 $\pm$ 0,05 abc | 0,506 $\pm$ 0,02 c   |
|      | S     | 23,39 $\pm$ 0,49 ab | 20,79 $\pm$ 0,64 a  | 0,346 $\pm$ 0,02 a   | 0,371 $\pm$ 0,01 ab  |
|      | R1    | 25,79 $\pm$ 0,63 b  | 23,35 $\pm$ 0,41 ab | 0,488 $\pm$ 0,02 bc  | 0,503 $\pm$ 0,02 c   |
|      | R2    | 24,46 $\pm$ 1,31 b  | 23,17 $\pm$ 0,61 ab | 0,503 $\pm$ 0,08 c   | 0,461 $\pm$ 0,03 abc |

| Parámetro | CO <sub>2</sub> | Sequía | CO <sub>2</sub> x Sequía |
|-----------|-----------------|--------|--------------------------|
| SLA       | ***             | n.s.   | n.s.                     |
| LWR       | n.s.            | *      | n.s.                     |

El \* hace referencia a diferencias significativas a nivel de  $P \leq 0,05$ ; \*\* a  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; n.s. no significativo

La  $[\text{CO}_2]$  no tuvo efecto significativo sobre LWR aunque en el día D16 las plantas regadas presentaron un LWR 11% superior a elevada  $[\text{CO}_2]$  que a  $[\text{CO}_2]$  ambiental (Tabla 6.5). Se observa que la fracción de la masa total invertida en hojas es superior bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  que bajo  $[\text{CO}_2]$  ambiental.

El efecto de la sequía sobre el porcentaje de biomasa del vástago frente a la biomasa total, LWR (Tabla 6.5), fue significativamente negativo ( $P \leq 0,05$ ). Plantas creciendo en sequía mostraron un LWR 24% y 27% menor respecto a sus plantas en riego del D16 en condiciones de  $[\text{CO}_2]$  ambiental y elevada  $[\text{CO}_2]$ , respectivamente. Cuando las plantas crecieron en condiciones de elevada  $[\text{CO}_2]$  y sequía también mostraron un LWR 7% superior que las plantas de  $[\text{CO}_2]$  ambiental y sequía.

Al restablecer el riego se observó que la relación de peso del vástago, LWR (Tabla 6.5) se recuperaba y el efecto negativo de la sequía desapareció bajo ambas  $[\text{CO}_2]$ . En el caso de  $[\text{CO}_2]$  ambiental se observó que tanto R1 como R2 superaron (7-

10%) el LWR de plantas control en el D16. Igualmente, bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  los valores de LWR se recuperaron siendo el R1 un 99% y el R2 un 91% del LWR de plantas control en el D16 (Tabla 6.5). En el caso de las plantas rehidratadas no se observaron diferencias en el LWR respecto a la  $[\text{CO}_2]$ .

### 6.3. Discusión

Nuestros resultados indican que la  $[\text{CO}_2]$  y el contenido hídrico del suelo tienen una interacción significativa sobre el crecimiento de la planta. Los efectos positivos del elevado  $\text{CO}_2$  sobre el crecimiento de la planta están modulados por las condiciones de menor contenido hídrico del suelo. Esto coincide con varios estudios previos en los que se muestra cómo el crecimiento se ve estimulado por el elevado  $\text{CO}_2$  más en condiciones de sequía que bajo riego (Gifford, 1992; Conroy y Hocking, 1993; Poorter, 1998; Catovsky y Bazzaz, 1999; Ward et al., 1999; Wu y Wang, 2000; Zhao et al., 2006).

#### 6.3.1. Parámetros absolutos

La  $[\text{CO}_2]$  a la que crecían las plantas aumentó significativamente la biomasa total de cebada ( $P \leq 0,001$ ) (Fig. 6.5). Resultados similares obtuvieron Centritto et al. (2002), Usuda (2004) y de Souza et al. (2008). Además Kimball (1983), y Eamus y Jarvis (1989), en exhaustivas revisiones, en los que analizaron el efecto del elevado  $\text{CO}_2$  en la productividad en numerosas especies y mostraron un aumento de biomasa seca total a elevada  $[\text{CO}_2]$ .

El mayor peso seco por planta, a elevada  $[\text{CO}_2]$  comparado con  $[\text{CO}_2]$  ambiental, puede ser debido a una mayor asimilación fotosintética (capítulo 4) (Centritto et al., 2002) y/o a una acumulación de carbohidratos estructurales y de almacenamiento (Agüera et al., 2006) en cebada a elevada  $[\text{CO}_2]$  (Pérez-López et al., 2010). Como ha sido demostrado por Pérez-López (2008) plantas de cebada de la misma variedad que nuestro estudio creciendo a elevada  $[\text{CO}_2]$  presentaron más almidón por peso seco que las plantas de  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Además, autores como Stitt (1991), Nie et al. (1995), Makino y Mae (1999) y Pérez-López et al. (2010) han observado en diversas especies C3 una mayor acumulación de almidón y azúcares solubles bajo condiciones de elevada



[CO<sub>2</sub>] que bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental. El aumento del contenido en carbohidratos es el cambio más pronunciado y universal observado en hojas de plantas C3 creciendo en condiciones de elevado CO<sub>2</sub> (Drake et al., 1997; Long et al., 2004).

Las plantas crecen debido al aumento en el contenido de agua celular. El alargamiento de las células ocurre gracias a la entrada por ósmosis del agua a su interior, de forma que la presión de turgencia aumenta. Esto hace que las paredes celulares se extiendan (Antolín, 1991). La estrecha dependencia de este proceso con el agua ocasiona fuertes respuestas del crecimiento cuando las plantas sufren limitaciones en el suministro hídrico del suelo (Pigeaire et al., 1988; Westgate y Boyer, 1985). El peso seco total descendió notablemente con el tratamiento de sequía ( $P \leq 0,001$ ) (Fig. 6.5A). Centritto et al. (2002) y Erice et al. (2010) obtuvieron descensos en la producción de biomasa seca total como consecuencia de la sequía bajo ambas [CO<sub>2</sub>].

La elevada [CO<sub>2</sub>] atmosférica causó un aumento de la biomasa total (Fig. 6.5) en plantas de sequía comparando con plantas creciendo bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental y en las plantas de recuperación R1 y R2 al final del experimento. También otros autores hallaron un aumento de la biomasa seca total por efecto de la elevada [CO<sub>2</sub>] en plantas sometidas a sequía comparado con plantas crecidas bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental (Centritto et al., 2002). Las plantas hídricamente estresadas tomaron menos agua que las bien regadas y esto, a su vez, tuvo un marcado efecto en la asimilación fotosintética y en el crecimiento de la planta.

En este trabajo, el elevado CO<sub>2</sub> provocó un aumento del área de la parte aérea (Fig. 6.6) en plantas regadas al final del estudio. De acuerdo a Kimball et al. (2002) el rango en el que oscila el efecto del CO<sub>2</sub> (600 ppm) sobre el área foliar en plantas C3 es de entre -16% a 24%, mostrando de nuevo la gran variabilidad de respuesta debida a la especie vegetal y/o a las condiciones de crecimiento. Pett (1986) también observó que el área foliar de pepino fue aumentada por el elevado CO<sub>2</sub> durante el periodo inicial de crecimiento pero no en etapas posteriores. Por lo tanto, el efecto del elevado CO<sub>2</sub> varía según diferentes estudios. Así, se han descrito aumentos del área foliar (Curtis et al. 1995; Vu et al., 2006; Wulef y Strain, 1982), y disminuciones (Ziska y Teramura, 1992). En la revisión realizada por Pritchard et al. (1999) en la que fue analizado el efecto de la elevada [CO<sub>2</sub>] sobre el crecimiento vegetal observaron que las plantas utilizadas en cultivos extensivos presentaron el mayor aumento de área foliar provocado por el aumento de CO<sub>2</sub> comparado con leñosas y no leñosas (silvestres).

Por otro lado, la producción de área de la parte aérea se vio negativamente afectada por la sequía ( $P \leq 0,01$ ). El mayor descenso de área de la parte aérea fue en las plantas de sequía más larga, D16, bajo ambas  $[CO_2]$  (65%). Wu y Wang (2000) observaron un efecto negativo y progresivo de la sequía sobre el área foliar en *Vicia faba* en condiciones de sequía moderada y severa. Bacelar et al. (2007) también obtuvieron descensos en el área foliar por planta en olivos sometidos a sequía. En nuestros resultados obtuvimos el mismo descenso de área de la parte aérea tanto a elevada  $[CO_2]$  como a  $[CO_2]$  ambiental provocado por la sequía y lo mismo observaron Centritto et al. (2002). Por el contrario, Wu y Wang (2000) observaron que las plantas crecidas bajo elevada  $[CO_2]$  presentaban mayores descensos en el área foliar en plantas de sequía que en condiciones de  $[CO_2]$  ambiental y sequía.

En condiciones de sequía tanto la extensión de la pared celular como la toma de agua – los dos procesos involucrados en la expansión celular – son inhibidos (Boyer, 1968; Jones, 1985). Estos procesos se reflejan en la disminución tanto del contenido hídrico de la planta como en el  $\Psi_w$  lo que provoca la reducción del área total por planta. De esta manera, se puede considerar a estas respuestas como mecanismos para evitar la deshidratación porque minimizan la pérdida de agua por transpiración, permitiendo a la planta resistir más tiempo a la falta de agua mientras las hojas se mantienen fotosintéticamente activas (Dichio et al., 2002).

Plantas de cebada sometidas a sequía y elevada  $[CO_2]$  presentaron un 12% más de área que plantas en sequía bajo  $[CO_2]$  ambiental al final del experimento (Fig. 6.6). El crecimiento foliar y, por tanto, el área foliar se ven frecuentemente alterados por cambios en el potencial hídrico de la planta (Boyer, 1968; Yegappan et al., 1982; Taylor et al., 1994). Esto, añadido a la observación de que el crecimiento bajo elevada  $[CO_2]$  mejora la eficiencia en el uso del agua, ha permitido que se atribuya el aumento de crecimiento foliar de plantas crecidas bajo elevada  $[CO_2]$  a una mayor presión de turgencia celular (Madson, 1968). Wu y Wang (2000) dedujeron de sus resultados que el efecto de la  $[CO_2]$  era mayor sobre plantas en riego que en sequía, ya que el área foliar en plantas regadas y elevada  $[CO_2]$  era muy superior (78%) que en plantas de  $[CO_2]$  ambiental, y, en cambio, en plantas de sequía y elevada  $[CO_2]$  era ligeramente superior que a  $[CO_2]$  ambiental. En nuestros resultados el efecto del  $CO_2$  sobre el área siempre fue ligeramente superior sobre plantas regadas (19%) que sobre plantas en sequía.

Cuando analizamos la distribución de la biomasa seca total, parte aérea y la subterránea observamos que el impacto de la elevada  $[\text{CO}_2]$  sobre la producción de biomasa del vástago en cebada ha sido significativamente positivo en plantas regadas (Tabla 6.1). Resultados similares se han observado por otros autores en diversas especies (Kimball et al., 1995; Cardoso-Vilhena y Barnes, 2001; Lee et al., 1997; Centritto et al., 2002; Zhao et al., 2006; Agüera et al., 2006; Vu et al., 2006; de Souza et al., 2008; Curtis y Wang, 1998; DeLucia et al., 1999; Norby et al., 1999; Smith et al., 2000; Tissue et al., 2001; Usami et al., 2001; Niklaus et al., 2001; Woodward, 2002; Eichelmann et al., 2004). El efecto de la sequía sobre la producción de biomasa seca del vástago en cebada provocó un marcado descenso (65%) respecto a las plantas regadas bajo ambas  $[\text{CO}_2]$ . La elevada  $[\text{CO}_2]$  tuvo un efecto significativamente positivo también en condiciones de sequía sobre la producción de biomasa del vástago. Wu y Wang (2000) y Centritto et al. (2002) observaron una estimulación de la producción de biomasa aérea en plantas sometidas a un estrés hídrico moderado y elevada  $[\text{CO}_2]$  comparado con plantas crecidas en sequía y  $[\text{CO}_2]$  ambiental.

La producción de biomasa radical fue superior en plantas creciendo bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  comparado con plantas crecidas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental durante todo el experimento. También Fernández et al. (2002), Vu et al. (2006), Dyckmans y Flessa (2002) y Mao et al. (2005) hallaron un efecto positivo de la elevada  $[\text{CO}_2]$  en el peso de la parte subterránea de la planta. Las raíces son los sumideros de carbono más extensos para gran cantidad de especies vegetales. Por lo tanto, bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  los fotoasimilados son mayoritariamente utilizados para el desarrollo de estos sumideros (Ziska et al., 1995), de ese modo se mantendría una fotosíntesis neta sostenida/prolongada a elevada  $[\text{CO}_2]$  (Long et al., 1993) y de esa manera no se produce aclimatación. La redistribución de fotoasimilados hacia las raíces de plantas bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  produce una mayor expansión celular que a su vez estaría causada por una mayor extensibilidad de la pared más que por una mayor división celular (Ferris y Taylor, 1994).

La biomasa radical en plantas de cebada sometidas a estrés hídrico leve (9 días de sequía) se vio fuertemente aumentada. En cambio, a medida que el estrés se hacía más severo la producción de biomasa radical se vio negativamente afectada hasta descender por debajo de los valores control. Algunos autores citan que dependiendo de la severidad del estrés hídrico y del cultivar, la biomasa radical aumenta, permanece igual o disminuye respecto a las plantas regadas (Centritto et al., 2002; Silveira et al., 2003; Erice et al., 2010). Cuando las plantas crecieron en sequía y elevada  $[\text{CO}_2]$

siempre mostraron mayor cantidad de biomasa radical que las plantas de [CO<sub>2</sub>] ambiental. Así, [Centritto et al. \(2002\)](#) también observaron en *Prunus persica* mayor producción de biomasa radical, en condiciones de sequía bajo elevada [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental.

El crecimiento es extremadamente sensible a la sequía y fuertemente influenciado por la habilidad de la raíz para crecer en suelos que van secándose y para mantener un estado hídrico óptimo de la planta ([Tyree y Alexander, 1993](#)). Cualquier cambio en la distribución de biomasa provocada por la elevada [CO<sub>2</sub>] podría, así mismo, influenciar el crecimiento de la planta bajo restricción hídrica. Por otro lado, [Poorter y Nagel \(2000\)](#) puntualizaron que la variación de localización de biomasa dependía ligeramente de la disponibilidad hídrica e incluso no era modificada por la [CO<sub>2</sub>]. Cuando analizamos el efecto de la [CO<sub>2</sub>] sobre el cociente R/A a lo largo del estudio en condiciones de riego observamos valores similares bajo ambas [CO<sub>2</sub>] (Tabla 6.2). Esto podría deberse a que tanto la masa aérea como la masa radical fueron aumentando de forma paralela a elevada [CO<sub>2</sub>]. Al igual que en nuestro estudio, cuando [Ferrario-Mery et al. \(1997\)](#) y [Geiger et al. \(1999\)](#) crecieron plantas en riego y elevada [CO<sub>2</sub>] no vieron diferencias en el cociente R/A comparado con plantas creciendo bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental. Por otro lado, [Baxter et al. \(1997\)](#) y [Fernández et al. \(2002\)](#) encontraron diferencias en el cociente R/A provocadas por la elevada [CO<sub>2</sub>]. Bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental el crecimiento de la parte aérea fue menor que el de la parte radical y esto, en consecuencia, aumentó el cociente R/A.

El cociente R/A (Tabla 6.2) fue mayor en las plantas sometidas a restricción hídrica que en las regadas bajo ambas [CO<sub>2</sub>], lo cual se debió a que la raíz resultó menos afectada por la sequía que la parte aérea. Estos resultados son frecuentes en respuesta a déficits hídricos de diversa intensidad como rasgo de adaptación a la sequía ([Hamblin et al., 1990](#); [Sánchez-Díaz et al., 1990](#); [Bhattacharya et al., 1990](#); [Cannell y Dewar, 1994](#); [Prior et al., 1997](#); [Yin et al., 2005](#); [Martin y Stephens, 2006](#); [Villagra y Cavagnaro, 2006](#); [Erice et al., 2007](#)). Las plantas en condiciones de sequía disminuyen la producción de biomasa del vástago y pueden aumentar la biomasa radical, manteniendo cocientes R/A más elevados. Así, la sequía severa incrementaría la relación R/A para minimizar la pérdida de agua, aumentar la absorción realizando mayor prospección del suelo y lograr mayor almacenaje de C y N ([Volenc et al., 1996](#); [Avice et al., 2003](#)).

La estimulación del crecimiento llevada a cabo por el elevado CO<sub>2</sub> condujo a una *EUA* significativamente mayor (Fig. 6.7). Resultados similares hallaron [Picon et al.](#)

(1996) y Wullschleger et al. (2002). En nuestros resultados observamos que la mejora de la *EUA* se mantiene a lo largo del tiempo en plantas regadas y crecidas bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  y se incrementó ligeramente bajo  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Sin embargo, según Samarakoon y Gifford (1995) el impacto del  $\text{CO}_2$  sobre la *EUA* cuando la hidratación del suelo es alta tiende a disminuir con el tiempo.

La sequía afectó significativamente a la *EUA*, lo que resultó en un marcado aumento de ésta. También Arp et al. (1998) y De Luis et al. (1999) obtuvieron valores de incremento de *EUA* de más del 180% en tratamientos de sequía comparando con los tratamientos de riego. Por otro lado, el efecto del elevado  $\text{CO}_2$  sobre la *EUA* provoca un incremento de ésta que sobrepasa la caída de la tasa de transpiración, indicando que la mayor producción de biomasa seca también contribuye a la mejora de la *EUA*. En condiciones de sequía y elevada  $[\text{CO}_2]$  la *EUA* siempre fue muy superior que en plantas crecidas a  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Observaciones similares obtuvieron Wu y Wang (2000) y Centritto et al. (2002). Por otro lado, el enriquecimiento en  $\text{CO}_2$ , sobre las plantas rehidratadas, podría favorecer el mantenimiento de altas tasas de *EUA*. Esta mejor conservación del agua en la planta concuerda con los efectos positivos del elevado  $\text{CO}_2$  en la eficiencia del uso del agua de la planta (Fig. 6.7) hallados por otros autores (Allen, 1990; Ellsworth, 1999; Gavazzi et al., 2000; Hui et al., 2001; Liao y Wang, 2002; Wu y Wang 2000; Wu et al., 2002; 2004).

En nuestro estudio, observamos que tras la recuperación hídrica los valores de biomasa seca total y el área de la parte aérea superaron el 50% de sus plantas control al final de experimento. Esta recuperación de producción de biomasa y de área podría deberse a que se reanuda tanto la división como la expansión celular al restablecer el régimen de riego bajo ambas  $[\text{CO}_2]$ . Por otro lado, el elevado  $\text{CO}_2$  provocó que tanto la biomasa total como el área de las plantas en recuperación fueran ligeramente superiores (Fig. 6.6) que el de plantas de  $[\text{CO}_2]$  ambiental.

Por el contrario, no se observó recuperación de la biomasa radical ya que la biomasa radical de las plantas de los tratamientos R1 y R2 presentaban menos biomasa radical que las plantas en sequía. Al igual que en nuestro estudio, Silveira et al. (2003) y Erice et al. (2010) observaron que la biomasa radical de plantas previamente sometidas a sequía continuó disminuyendo tras la rehidratación. Esta respuesta podría deberse a que las plantas, en la primera fase de recuperación, priorizan la producción de la parte aérea para proporcionar nuevos tejidos fotosintetizadores.

### 6.3.2. Parámetros relativos

El RGR total de cebada crecido en riego osciló entre 0,128 y 0,132 gPS g<sup>-1</sup>PS día<sup>-1</sup> (Tabla 6.3). Según [Lambers et al. \(1990\)](#), el RGR total de plantas herbáceas creciendo en cámaras de crecimiento con un aporte óptimo de nutrientes oscila entre 0,100-0,300 gPS g<sup>-1</sup>PS día<sup>-1</sup>. En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas entre plantas regadas bajo diferente [CO<sub>2</sub>] aunque el RGR fue ligeramente superior bajo elevada [CO<sub>2</sub>] que bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental. Al igual que nosotros, [Heinemann et al. \(2006\)](#) en soja y [Garbutt et al. \(1990\)](#) en *Abutilon theophrasti* a 350 ppm ó 700 ppm de CO<sub>2</sub> tampoco observaron diferencias significativas en el RGR total. Se conoce que, generalmente, el elevado CO<sub>2</sub> aumenta el RGR en los primeros estadios de crecimiento de la planta y después no suele tener efecto ([Poorter, 1989](#)). En el presente experimento se comprobó que en el primer periodo de crecimiento, desde la siembra hasta el inicio del tratamiento con sequía el RGR era superior a elevado [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental y que desde el D0 hasta el D9, las plantas en riego presentaron un 31% más de RGR total a elevada [CO<sub>2</sub>] que a [CO<sub>2</sub>] ambiental. Según [Poorter \(1993\)](#) las diferencias en la producción de biomasa absoluta debidas a la [CO<sub>2</sub>] eran causadas por cambios de RGR en fases iniciales, esto es, por cambios muy tempranos en la producción de biomasa. Otros autores han observado un efecto positivo, negativo o ningún efecto de la elevada [CO<sub>2</sub>] sobre el RGR ([Wulef y Strain, 1982](#); [Poorter et al., 1988](#); [Musgrave y Strain, 1988](#); [Atkin et al., 1999](#); [Pritchard et al., 1999](#); [Makino et al., 2000](#)). Esto puede ser debido a que, en periodos de larga exposición, el elevado CO<sub>2</sub> a nivel de planta entera puede producir limitaciones bioquímicas, limitaciones ultraestructurales o cambios a nivel de cultivo - p.ej. autosombreamiento- ([Lambers y Poorter, 1992](#)).

En el caso del RGR total se vio un efecto significativo de la sequía puesto que al final del experimento se obtuvo un descenso respecto a las plantas regadas, bajo ambas [CO<sub>2</sub>]; siendo este descenso mayor bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental (29%). Al igual que nosotros, otros autores obtuvieron descensos del RGR total en especies sometidas a sequía ([Galmés et al., 2005](#); [Erice et al., 2010](#)). La caída de RGR en plantas de cebada sometidas a sequía fue asociada a los cambios en NAR y LAR. [Bacelar et al. \(2007\)](#) observaron en olivo en sequía disminuciones del RGR así como disminuciones en el NAR y LAR. Por el contrario, en nuestro experimento el NAR aumentó con la sequía

bajo ambas  $[\text{CO}_2]$  y el LAR descendió con la sequía bajo ambas  $[\text{CO}_2]$ . Así, en condiciones de sequía y elevada  $[\text{CO}_2]$  podríamos decir que el marcado aumento del NAR (componente funcional que depende de las tasas de asimilación y respiración) compensaría el descenso de LAR (componente morfológico determinado por el área foliar por unidad de biomasa total por planta) proporcionando un RGR ligeramente mayor a elevada  $[\text{CO}_2]$  que a  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Además, este descenso en el LAR vendría acompañado por la menor distribución de biomasa a las hojas (LWR).

A la hora de analizar el RGR por órgano observamos que la  $[\text{CO}_2]$  no afectó ni al RGR del vástago ni al RGR radical de las plantas con buena disponibilidad hídrica tras 16 días de estudio. En el ensayo llevado a cabo por [Heinemann et al. \(2006\)](#) con soja, observaron que tampoco había diferencias significativas en el RGR del vástago entre las plantas crecidas a 350 ó 700ppm de  $[\text{CO}_2]$ . Por el contrario, la sequía afectó significativamente al RGR del vástago (Tabla 6.3) afectando negativamente al desarrollo de la parte aérea de cebada. En cambio, el RGR radical no fue afectado significativamente por la sequía a cualquiera de las concentraciones de  $\text{CO}_2$ .

El NAR obtenido en nuestro estudio en condiciones de riego al final del experimento osciló entre 11,01 y 11,09  $\text{gPS m}^{-2} \text{ día}^{-1}$  (Tabla 6.4), valores que están entre los valores de 7-20  $\text{gPS m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ , publicados por [Lambers et al. \(1990\)](#) para plantas C3 creciendo con aporte óptimo de nitrógeno y una intensidad de luz moderada-alta. El elevado  $\text{CO}_2$  no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre el NAR en nuestro estudio. Esto iría en consonancia con la pérdida de estimulación de RGR bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  después de una exposición inicial de 2 semanas al elevado  $\text{CO}_2$  ([Ziska y Bunce, 1994](#)). A pesar de que no se hallaron diferencias significativas provocadas por la  $[\text{CO}_2]$ , en los tratamientos de sequía y recuperación obtuvimos mayor NAR en condiciones de elevada  $[\text{CO}_2]$ , lo cual estaría relacionado, principalmente, con un incremento en la tasa de fotosíntesis a nivel de planta entera por unidad de área foliar ([Wong, 1990](#); [Evans et al., 2000](#); [Poorter y Navas, 2003](#)) y con el aumento del área total ([Ziska y Bunce, 1994](#)) comparado con plantas crecidas bajo  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Resultados similares observaron [Prior y Rogers \(1995\)](#).

La sequía tuvo un efecto significativo sobre el NAR ( $P \leq 0,05$ ) aumentando en las plantas en sequía respecto a las plantas regadas bajo ambas  $[\text{CO}_2]$ . Este ligero aumento del NAR en sequía respecto al riego podría ser la consecuencia de un mayor autosombreamiento en plantas regadas que en plantas de sequía, sobre todo bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  ([Lambers y Poorter, 1992](#); [Ziska y Bunce, 1994](#)) debido a que las plantas en riego



producen gran cantidad de hojas y la luz no incide con la misma intensidad en todas ellas como sí lo hace en las plantas de sequía al tener un número de hojas muy inferior a las de riego. Por el contrario, lo frecuente en la bibliografía es encontrar estudios donde la sequía produce un descenso del NAR (Giorio et al., 1999; Liu y Stützel, 2004; Barcelar et al., 2007) ya que viene directamente influenciado por la asimilación fotosintética y ésta a su vez depende de la disponibilidad hídrica.

Los valores de LAR obtenidos en nuestro estudio oscilaron entre 11,63-11,89 m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup> PS en condiciones de riego al final del experimento (Tabla 6.4). Usuda (2004) obtuvo con *Raphanus sativus* L. cv Kosena valores de LAR que variaban entre 13,2 y 20,4 m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup> PS, valores cercanos al rango obtenido también por Lambers et al. (1990). En nuestro estudio, observamos que la [CO<sub>2</sub>] no tuvo efecto significativo sobre el LAR (Tabla 6.4). En cambio, el efecto de la sequía sobre el LAR sí fue significativamente negativo (Tabla 6.4), bajo ambas [CO<sub>2</sub>]. El menor número de hojas y la reducida expansión de las hojas jóvenes, en sequía, pudieron causar un descenso del LAR. Similares resultados se han observado en plantas de guisante y alfalfa sometidas a sequía (Anyia y Herzog, 2004; Erice et al., 2010). Plantas de cebada bajo elevada [CO<sub>2</sub>] y sequía presentaron menor tasa de LAR que a [CO<sub>2</sub>] ambiental. Prior y Rogers (1995) obtuvieron resultados similares.

Cuando se analizaron los dos componentes SLA y LWR del LAR, se observó que los valores de SLA oscilaban entre 23,50-25,61 m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup> PS en condiciones de riego al final del experimento (Tabla 6.5), valores que están dentro del rango 10-50 m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup> PS proporcionado por Lambers et al. (1990). La [CO<sub>2</sub>] provocó un efecto estadísticamente significativo sobre el SLA (Tabla 6.5). Observamos un descenso del SLA en las plantas en riego y elevada [CO<sub>2</sub>] respecto a las crecidas bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental. En otros estudios se han observado descensos del SLA por efecto del elevado CO<sub>2</sub> (Ford y Thorne, 1967; Porter y Grodzinski, 1984; Hrubec et al., 1985; Jolliffe y Ehret, 1985; Patterson et al., 1988; Garbutt et al., 1990; Ziska y Teramura, 1992; Rufty et al., 1994; Pritchard et al., 1999; Usuda 2004). El descenso del SLA bajo elevada [CO<sub>2</sub>] a menudo es resultado de una alteración en la anatomía foliar (aumentando el grosor y/o la densidad de las hojas) o de un incremento en la acumulación total de almidón y de azúcares no estructurales en la hoja, lo cual ocurre cuando la fijación de carbono excede la utilización del mismo (Prior y Rogers, 1995; Pritchard et al., 1999).



El patrón general del efecto de la sequía sobre el SLA fue negativo, descendiendo bajo ambas  $[\text{CO}_2]$ . También Xu y Zhou (2006a) vieron como el SLA disminuía a medida que el estrés hídrico aumentaba en *Leymus chinensis*. Estas variaciones en los componentes morfológicos están asociados con las estrategias de adaptación de las plantas a la sequía (Liu y Stützel, 2004), y su plasticidad podría mejorar la adaptación de las plantas a la misma. Si disminuye el SLA aumentaría la densidad de las hojas, hecho que está considerado como estrategia de mayor resistencia al estrés hídrico (Patterson et al., 1997; Marcelis et al., 1998; Erice et al., 2010) puesto que proporcionaría menor superficie transpiratoria (Morse et al. 2002). Según Maroco et al. (2000) un descenso en el SLA podría ocurrir en respuesta a la sequía en plantas herbáceas como resultado de una mayor inversión en tejidos estructurales permitiendo aumentar la resistencia a condiciones ambientales desfavorables.

El rango de LWR que obtuvimos en este estudio osciló entre 0,454 y 0,506  $\text{gPS g}^{-1}$  PS en condiciones de riego al final de los 16 días de experimento (Tabla 6.5). Según Lambers et al. (1990) los valores de LWR oscilan entre 0,300 y 0,800  $\text{gPS g}^{-1}$  PS en plantas crecidas en buenas condiciones de luz y aporte óptimo de nitrógeno. El efecto de la  $[\text{CO}_2]$  sobre el LWR no fue estadísticamente significativo aunque provocó un ligero aumento en las plantas de elevada  $[\text{CO}_2]$  respecto a las de  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Autores como Jolliffe y Ehret (1985), Patterson et al. (1988) y Poorter et al. (1988) vieron un efecto positivo del  $\text{CO}_2$  sobre el LWR en diferentes especies.

La sequía disminuyó significativamente el LWR bajo ambas  $[\text{CO}_2]$ . Tras 14 días en sequía el LWR se vio reducido en plantas de alfalfa según Erice et al. (2010). Este comportamiento indicaría que las plantas modificaban su proporción de la biomasa seca del vástago con respecto a la biomasa total para combatir la sequía. De este modo, viendo la localización de la biomasa y el análisis del crecimiento, también revelaría que este LWR es el componente principal del descenso observado en el LAR.

Los parámetros relativos estudiados mostraron una respuesta positiva al restablecimiento hídrico con lo que se confirma la recuperación de los parámetros absolutos y que todos ellos muestran que el daño provocado por la sequía es reversible. En la mayoría de ellos mejorado por la elevada  $[\text{CO}_2]$ .

## 6.4. Conclusiones

- En condiciones de riego y elevada  $[\text{CO}_2]$  se vio una estimulación de producción de biomasa total (tanto del vástago como de la raíz) respecto a la  $[\text{CO}_2]$  ambiental, lo que se tradujo en un aumento del RGR total y del LWR.
- En condiciones de sequía, la biomasa descendió, en mayor proporción en la parte aérea que en raíz, lo que se considera un mecanismo de adaptación ya que bajo restricción hídrica se incrementa la relación R/A para minimizar la pérdida de agua por transpiración (parte aérea) y aumentar la prospección del suelo (raíz).
- La reducción del crecimiento en condiciones de sequía es una respuesta al menor aporte hídrico y de nutrientes. Esto se refleja en una menor área de la parte aérea y menor producción de biomasa y como consecuencia obtuvimos menores tasas de RGR, LAR, SLA y LWR.
- Bajo sequía y elevada  $[\text{CO}_2]$  el descenso de crecimiento total y la reducción de las tasas de crecimiento relativo fueron similares en porcentaje que bajo  $[\text{CO}_2]$  ambiental, aunque se debe tener en consideración que en sequía la biomasa total, el área de la parte aérea, el RGR total, el NAR y el LWR fueron mayores a elevada  $[\text{CO}_2]$  que a  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Así, se pone de manifiesto que el elevado  $\text{CO}_2$  mantiene la tasa de crecimiento neto mayor con mejores tasas fotosintéticas y un mejor estado hídrico general de la planta.
- En la mayoría de los parámetros de crecimiento, tanto absolutos como relativos, se observó que tras la recuperación hídrica el efecto negativo de la sequía revertía. El elevado  $\text{CO}_2$  hizo que las plantas en recuperación hídrica presentaran resultados superiores que a  $[\text{CO}_2]$  ambiental.



# SÉPTIMO CAPÍTULO

## DISCUSIÓN GENERAL



## 7. DISCUSIÓN GENERAL

La sequía es, sin duda, la condición ambiental transitoria y extrema a que más frecuentemente se ven sometidas las plantas puesto que limita el crecimiento y la supervivencia vegetal. La disponibilidad hídrica es un factor crítico para evaluar los efectos del cambio climático sobre las plantas. Además también habría que tener en cuenta la respuesta fotosintética positiva al aumento de CO<sub>2</sub> atmosférico, que puede aliviar parcialmente el efecto negativo del aumento de sequía. Por otro lado, una [CO<sub>2</sub>] elevada aumenta la biomasa, el crecimiento de las raíces y el área total de las hojas, y altera las tasas de fotosíntesis neta, la conductancia estomática y la eficiencia en el uso del agua. No obstante, la magnitud de tales respuestas depende de la disponibilidad de agua, del contenido del nitrógeno en el suelo, de la temperatura o de la luz.

La cebada es uno de los cereales más cultivados y mejor adaptado a la sequía; por ello, en este estudio se ha realizado un análisis paralelo de la sequía y el elevado CO<sub>2</sub> en cebada (cultivar Iranis) así como su posible respuesta fisiológica a la recuperación hídrica tras la sequía.

En este trabajo se ha observado que durante el período de sequía, el elevado CO<sub>2</sub> retrasó en 3-4 días el agotamiento del contenido hídrico del suelo. Esta menor tasa de desecación del suelo estaba en concordancia con menores tasas de transpiración en las plantas crecidas en elevada [CO<sub>2</sub>], aún cuando el área foliar era mayor que en las plantas crecidas a [CO<sub>2</sub>] ambiental. La variación del  $\Psi_o$  observada se debió a la acumulación de solutos por una disminución del contenido hídrico celular por deshidratación. Por lo tanto, el mantenimiento de un potencial hídrico menos negativo en las plantas de elevado CO<sub>2</sub> sería más una consecuencia del control estomático y no del ajuste osmótico.

Este mejor estado hídrico en las plantas bajo sequía y elevado CO<sub>2</sub> se vio acompañado por un  $\Psi_{w_{md}}$  más alto, momento en el que la fotosíntesis y la apertura estomática son máximas. La reducción de  $g_s$ , inducida por el elevado CO<sub>2</sub>, ayudó a mantener un potencial hídrico más elevado. Sin embargo, la reducción de la conductancia hidráulica observada en nuestro trabajo podría compensar el efecto de los estomas y explicó en parte el menor  $\Psi_w$  observado en plantas a elevado CO<sub>2</sub>. Tanto en plantas regadas como en sequía, el elevado CO<sub>2</sub> causó una reducción del uso total de agua y un aumento en la *EUA*. Esta conservación del agua del suelo podría ser

suficiente para prolongar el período de fotosíntesis y crecimiento cuando el agua llega a ser limitante.

La cebada creciendo a elevada  $[\text{CO}_2]$  mostró una reducida  $g_s$  como consecuencia del cierre parcial de estomas. El aumento de  $C_i$  originado por la elevada  $[\text{CO}_2]$  puede provocar el cierre parcial de los estomas. Por otro lado, pudimos observar que el cierre estomático también responde a la disminución de la hidratación edáfica. A medida que el suelo se va secando, el nivel de ácido abscísico aumentaría, y esto podría inducir la reducción de  $g_s$ . Por consiguiente, las plantas creciendo a elevada  $[\text{CO}_2]$  en suelos deshidratados muestran mayor cierre estomático que las plantas que lo hacen a  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Por lo tanto, se da un cierre estomático mayor, una transpiración menor y una conservación del agua del suelo mayor. Adicionalmente, la reducción de la  $g_s$  inducida por el elevado  $\text{CO}_2$  produce un mayor  $\Psi_w$ . A pesar de una  $g_s$  menor, el valor de  $C_i/C_a$  mayor en plantas a elevada  $[\text{CO}_2]$  alcanzado a un mismo nivel de estrés hídrico permitió a las plantas que presentaran mayores tasas de  $A$  que plantas bajo  $\text{CO}_2$  ambiental. La estimulación de la  $A$  llevada a cabo por el elevado  $\text{CO}_2$  fue mayor en plantas de sequía comparando con las de riego. La sensibilidad estomática al  $\text{CO}_2$  condujo a una reducción de  $g_s$  y esto contribuyó a la reducción de la  $E$  observada en las plantas de elevado  $\text{CO}_2$ .

Los resultados del mayor rendimiento cuántico a elevada  $[\text{CO}_2]$  demuestran que el funcionamiento del transporte de electrones en el cloroplasto se mantenía mejor en condiciones de elevada  $[\text{CO}_2]$  tanto si se regaban las plantas como si se mantenían en sequía, donde se vio que el efecto fue aún mayor. Por otro lado, las plantas de nuestro estudio no mostraron aclimatación fotosintética. Ello puede ser debido a la mayor cantidad de nitrato aportado en la solución de riego utilizada durante todo el experimento. A medida que el suelo se iba secando, tanto la aclimatación estomática como la respuesta directa de  $g_s$  a la elevada  $[\text{CO}_2]$  varió con la sequía. En plantas sometidas a sequía la doble  $[\text{CO}_2]$  causó una leve aclimatación estomática en el último día de sequía.

Bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  observamos mayor capacidad de fijar carbono al mismo tiempo que se reducía la fotorrespiración, lo que se traducía en una  $A_{max}$  superior y en un aumento de la actividad Rubisco, como se deduce del aumento en la eficiencia de carboxilación,  $CE$ . Se ha observado también un efecto negativo del estrés hídrico sobre  $A_{max, C_i}$ ,  $CE$ , y un mayor efecto sobre  $J_{max}$  que sobre  $V_{cmax}$ , lo que indica que la regeneración de la RuBP se vio más afectada por la sequía que la actividad carboxilasa

de la Rubisco bajo ambas  $[\text{CO}_2]$ . A medida que la sequía se hace más severa aumenta el consumo mitocondrial de azúcares, reflejado en un mayor punto de compensación del  $\text{CO}_2$  y la respiración.

Aunque el crecimiento a elevada  $[\text{CO}_2]$  induce cierre estomático, la estimulación de la fotosíntesis compensa cualquier limitación difusional impuesta por los estomas. A pesar de la alta correlación entre la fotosíntesis y la conductancia estomática, el impacto de la limitación mesofilica sobre la fotosíntesis podría haber sido mayor. La inhibición de la carboxilación y el descenso en la translocación de fotosintatos (TPU) podrían incrementar la limitación no estomática de la fotosíntesis. Hemos observado que la  $L_m$ , en condiciones de estrés hídrico, ha sido atribuida a la reducción de la regeneración de la RuBP. Pero no podemos obviar la importancia relativa de la reducción de la  $A$  relacionada con la resistencia del mesófilo.

En nuestro estudio, una mayor eficiencia fotoquímica obtenida en plantas bajo elevada  $[\text{CO}_2]$ , tanto en sequía como en riego, se relacionó con un aumento del transporte lineal de electrones y una mayor eficiencia metabólica en la utilización del ATP y del NADPH. En condiciones de sequía la  $A_{max,luz}$  disminuyó fuertemente debido al cierre estomático y al daño metabólico que se deduce del descenso en la eficiencia fotoquímica. Además, las plantas creciendo a elevada  $[\text{CO}_2]$  mostraron una capacidad de regeneración de la RuBP mayor, así como un incremento de actividad potencial Rubisco, confirmada por una mayor eficiencia de carboxilación. Por otro lado, las plantas creciendo bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  presentaron mayor rendimiento cuántico para eficiencias fotoquímicas similares ( $\Phi\text{CO}_2/\Phi\text{PSII}$ ).

La sequía provoca mayor sensibilidad del aparato fotosintético a la fotoinhibición puesto que la absorción de luz excede a la utilizada por la fotosíntesis. Las reducciones observadas en el  $qP$  y en la  $\Phi\text{PSII}$  con la leve variación de  $F_v/F_m$  podrían estar asociadas con una aclimatación del PSII durante el estrés hídrico, representando así un mecanismo de fotoprotección para igualar la tasa fotoquímica con el consumo de ATP y NADPH. Sin embargo, la sequía no provocó un daño permanente en el aparato fotosintético (baja variación del  $F_v/F_m$ ) gracias al mantenimiento del flujo de electrones hacia reacciones de oxigenación, como son la fotorrespiración y la reacción de Mehler, que minimizan y previenen el daño al PSII. A esto se añade que el elevado  $\text{CO}_2$  estimuló la tasa de transporte electrónico destinado a carboxilación, aumentando la tasa total de transporte de electrones,  $ETR-J_t$  como resultado de los cambios cinéticos de la Rubisco y disminución de la fotorrespiración. Además, bajo



elevada [CO<sub>2</sub>], las plantas presentaron mayor concentración de pigmentos fotosintéticos que bajo [CO<sub>2</sub>] ambiental. Por lo tanto, la inhibición no estomática de la fotosíntesis fue muy significativa en condiciones de sequía lo que corrobora que la fotosíntesis estuvo determinada tanto por la pérdida de actividad de los cloroplastos como por el incremento de la resistencia a la difusión de CO<sub>2</sub>.

En paralelo al aumento de fotosíntesis, en este estudio se observó una actividad NR mayor en plantas bajo elevada [CO<sub>2</sub>]. El efecto positivo del elevado CO<sub>2</sub> fue mayor en la actividad NR-Mg<sup>2+</sup>, lo que a su vez provocó la mejora del estado de activación del enzima NR. Además, hemos detectado que en las plantas cultivadas en sequía y elevada [CO<sub>2</sub>], el efecto del estrés hídrico sobre la actividad NR fue menor. Sin embargo, el déficit hídrico causa una disminución de la transpiración, provocando un descenso en la absorción de nitrato por las raíces y su transporte a las hojas. Con ello, se vieron afectadas tanto la actividad NR-EDTA como la actividad NR-Mg<sup>2+</sup>, de manera que el estado de activación de la NR también se redujo.

Las tasas más altas de asimilación de carbono bajo elevada [CO<sub>2</sub>] y, concomitantemente, la mayor disponibilidad de hidratos de carbono hicieron aumentar la actividad GS. En cuanto al estrés hídrico, la disminución de la actividad GS se correlacionó con aquel, y como consecuencia de la inhibición fotosintética en plantas de sequía, la energía y los esqueletos carbonados utilizados por la vía GS/GOGAT y proporcionados por la fotosíntesis se podrían reducir considerablemente, lo que a su vez podría tener un efecto negativo en la GS porque es el nivel de energía interna lo que la regularía. Bajo elevada [CO<sub>2</sub>], el ATP y los esqueletos carbonados necesarios para la asimilación del amonio fueron más abundantes. Por lo tanto se espera que la sequía tenga un menor efecto sobre la tasa de actividad GS, como hemos observado en este estudio. Por otra parte, para Ψ<sub>w</sub> similares, la tasa de actividad GS fue mayor bajo elevada [CO<sub>2</sub>] en comparación con la [CO<sub>2</sub>] ambiental, corroborando que el mayor suministro de energía y carbohidratos permitió una mayor actividad GS.

Por otro lado, en sequía la fotosíntesis se reduce, lo que provoca que la demanda de energía deba satisfacerse por otras vías como pueden ser a partir del carbono liberado de los aminoácidos a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos. La desaminación de aminoácidos a través del aumento de actividad GDH-NAD proporcionaría esqueletos carbonados para su utilización en la respiración. Este aumento de la respiración bajo estrés hídrico se cree que es necesario para proporcionar energía a mecanismos de tolerancia al estrés. Cuando las plantas se cultivaron en sequía y elevada [CO<sub>2</sub>], el Ψ<sub>w</sub>

fue menos negativo, la fotosíntesis se mantuvo menos afectada por la sequía, la actividad GS fue más constante, y el aumento de la actividad de GDH-NAD, por consiguiente, también fue menor.

A pesar de que varios autores han obtenido disminuciones en el contenido de proteína soluble en condiciones de elevada  $[\text{CO}_2]$  debido al efecto de dilución, nosotros hallamos mayor concentración de proteína soluble que bajo  $[\text{CO}_2]$  ambiental. La concentración supraóptima de nitrógeno pudo haber sido la causa de que no ocurriera dicho efecto de dilución. Por el contrario, el contenido de proteína soluble disminuyó a medida que avanzaba el estrés hídrico. Sin embargo, cuando las plantas crecieron bajo elevada  $[\text{CO}_2]$ , la tasa de fotosíntesis fue mayor, al igual que las actividades NR y GS, por lo que la sequía tuvo un efecto menor sobre el contenido de proteína soluble.

Por otro lado, el agua es el principal factor limitante para la productividad vegetal habiéndose sugerido que el efecto positivo de la elevada  $[\text{CO}_2]$  sobre el crecimiento de las plantas podría depender del estado hídrico de las mismas. El elevado  $\text{CO}_2$  tendría menor efecto sobre plantas bien regadas en una fase de crecimiento óptimo, efecto intermedio sobre plantas en condiciones de sequía moderada y efecto mucho más beneficioso sobre plantas bajo sequía severa, resultando finalmente en un incremento apreciable del crecimiento vegetal. Nuestros resultados indican que la  $[\text{CO}_2]$  y el contenido hídrico del suelo tienen una interacción significativa sobre el crecimiento de la planta.

La  $[\text{CO}_2]$  a la que crecían las plantas aumentó significativamente la biomasa total y el área de la parte aérea de cebada debido a una mayor asimilación fotosintética, lo que puede traducirse en un incremento tanto de los carbohidratos estructurales como de almacenamiento. La producción de biomasa seca total y de área de la parte aérea disminuyó fuertemente como consecuencia de la sequía bajo ambas  $[\text{CO}_2]$  ya que las plantas crecen debido al aumento en el contenido de agua celular. El alargamiento de las células ocurre gracias a la entrada por ósmosis del agua a su interior, de forma que la presión de turgencia aumenta. Esto hace que las paredes celulares se expandan. En condiciones de sequía tanto la extensión de la pared celular como la toma de agua – los dos procesos involucrados en la expansión celular – son inhibidas. La reducción del área total por planta se puede considerar un mecanismo para evitar la deshidratación porque minimiza la pérdida de agua por transpiración, permitiendo a la planta resistir más tiempo a la falta de agua mientras las hojas se mantienen fotosintéticamente activas.

Las plantas hídricamente estresadas tomaron menos agua que las bien regadas y esto, a su vez, tuvo un marcado efecto en la asimilación fotosintética y en el crecimiento de la planta. Sin embargo, plantas de cebada sometidas a sequía y elevada  $[\text{CO}_2]$  presentaron mayor biomasa y área que plantas en sequía bajo  $[\text{CO}_2]$  ambiental al final del experimento. El crecimiento foliar y, por tanto, el área foliar es frecuentemente alterado por cambios en el potencial hídrico de la planta. Además, el crecimiento bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  mejoró la eficiencia en el uso del agua.

Cualquier cambio en la distribución de biomasa provocada por la elevada  $[\text{CO}_2]$  podría influenciar el crecimiento de la planta bajo restricción hídrica. Las raíces son los sumideros de carbono más extensos para gran cantidad de especies vegetales. Bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  se ha visto que la estimulación del crecimiento radical es preferencial en nuestras plantas objeto de estudio. Esto puede ser debido a una mejor redistribución de fotoasimilados hacia las raíces de plantas bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  donde sucede una mayor expansión celular causada por una mayor extensibilidad de la pared más que por una mayor división celular. Es un hecho conocido que dependiendo de la severidad del estrés hídrico y del cultivar la biomasa radical aumenta, permanece igual o disminuye respecto a las plantas regadas. Cuando analizamos el cociente R/A observamos que la elevada  $[\text{CO}_2]$  mejoró el crecimiento de todas sus partes vegetativas proporcionalmente. En las plantas sometidas a restricción hídrica la raíz resultó menos afectada por la sequía que la parte aérea en respuesta a déficits hídricos como rasgo de adaptación a la sequía. Así, la sequía severa incrementaría la relación R/A para minimizar la pérdida de agua y aumentar la absorción realizando mayor prospección del suelo.

El hecho de que nuestras plantas presentaran porcentajes de descenso de RGR total similares bajo ambas  $[\text{CO}_2]$  refleja porcentajes similares de descensos en producción de biomasa y área de la parte aérea en condiciones de sequía. A pesar de esto, las tasas de crecimiento relativo siempre fueron superiores a elevada  $[\text{CO}_2]$  con lo que la producción neta siempre se mantuvo superior. Esto significa que las plantas de elevada  $[\text{CO}_2]$ , en riego o en sequía, presentaban una ligera ventaja en cuanto a disposición de agua y nutrientes cuando se comparan plantas de la misma edad, ya que las de elevada  $[\text{CO}_2]$  presentan una tasa de desecación más lenta, más conservativa.

La caída de RGR en plantas de cebada sometidas a sequía fue asociada a los cambios en NAR y LAR. Así, en condiciones de sequía y elevada  $[\text{CO}_2]$  podríamos afirmar que el descenso de LAR se correlacionaría con el descenso de RGR. Además, este descenso en el LAR vendría acompañado por la menor distribución de biomasa a

las hojas (LWR) produciendo hojas con mayor densidad tisular. Los cambios obtenidos en el LAR y en el SLA bajo elevada  $[\text{CO}_2]$  sugieren que las plantas dirigirían menos carbono para producción de nueva área foliar acumulando más masa por unidad de superficie. En este caso, se formarían hojas más gruesas ya que se incrementaría la acumulación total de almidón y de azúcares no estructurales en la hoja. Por otro lado, el menor número de hojas y la reducida expansión en hojas jóvenes, en condiciones de sequía, pudieron causar el descenso del LAR. La sequía disminuyó el LWR bajo ambas  $[\text{CO}_2]$ . Esto indicaría que las plantas modificaban su proporción de biomasa seca del vástago con respecto a la biomasa total para combatir la sequía.

Cuando las plantas se sometieron a recuperación hídrica se vio que la producción de biomasa seca total puede volver a aumentar cuando la planta se rehidrata, así como la división y expansión celular se reanudaron al restablecer el régimen de riego bajo ambas  $[\text{CO}_2]$ . Así, también revirtió el efecto de la sequía sobre los parámetros de crecimiento relativo. Además, el elevado  $\text{CO}_2$  provocó un área foliar ligeramente superior y una mayor biomasa total en plantas de elevada  $[\text{CO}_2]$  comparado con plantas de  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Por el contrario, no se observó recuperación de la biomasa radical. Esta respuesta de la parte subterránea puede deberse a que tras la rehidratación la planta invierte toda su energía en producir parte aérea, biomasa potencialmente fotosintetizadora.

Del presente estudio, se concluye que los procesos metabólicos de las plantas de cebada son sensibles a los efectos de la sequía cuando crecen a las actuales concentraciones de  $\text{CO}_2$ , pero que cuando el estrés hídrico se simultanea con condiciones de elevada  $[\text{CO}_2]$ , dichos efectos se ven mitigados. Por tanto, se deduce que el elevado  $\text{CO}_2$  protege a las plantas de cebada lo que les facilitaría una mejor adaptación a las condiciones climáticas futuras.



# OCTAVO CAPÍTULO

## BIBLIOGRAFÍA



- Abd- El Baki GKA-E, Siefritz F, Man HM, Weiner H, Kaldenhoff R, Kaiser WM (2000) Nitrate reductase in *Zea mays* L. under salinity. *Plant, Cell and Environment*, 23: 515-521.
- Ackerson RC (1985) Osmoregulation in cotton in response to water stress. *Plant Physiology*, 77: 309-312.
- Agüera E, Ruano D, Cabello P, de la Haba P (2006) Impact to atmospheric CO<sub>2</sub> on growth, photosynthesis and nitrogen metabolism in cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *Journal of Plant Physiology*, 163: 809-817.
- Allen JLH, Boote KJ, Jones JW, Jones PH, Valle RR, Acock B, Rogers HH, Dahlman RC (1987) Response of vegetation to rising carbon dioxide: photosynthesis, biomass, and seed yield of soybean. *Global Biogeochemical Cycles*, 1: 1-14.
- Allen JLH (1990) Plant responses to rising carbon dioxide and potential interactions with air pollutants. *Journal of Environmental Quality*, 19: 15-34.
- Allen JLH (1994) Carbon dioxide increase: direct impacts on crops and indirect effects mediated through anticipated climate changes. En: Boote KJ, Bennett JM, Sinclair TR, Paulse GM (eds.) "Physiology and Determination of Crop Yield; pp. 425-459". American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison.
- Allen JLH, Amthor JS (1995) Plant physiological responses to elevated CO<sub>2</sub>, temperature, air pollution, and UV-B radiation. En: Woodwell GM, Mackenzie FT (eds.) "Biotic feedbacks in the global climate system: Will the warning feed the warning?"; pp. 51-84". Oxford University Press, New York.
- Amthor JS (1995) Terrestrial higher-plant response to increasing atmospheric [CO<sub>2</sub>] in relation to the global carbon cycle. *Global Change Biology*, 1: 243-274.
- Andrews M (1986) The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant, Cell and Environment*, 9: 511-519.
- Andrews M, Morton JD, Liefering M, Bisset L (1992) The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of a range of temperate cereals and pasture grasses. *Annals of Botany*, 70:271-276.
- Antolín MC (1991) Estudio de la fotosíntesis, relaciones hídricas y acumulación de solutos en plantas de alfalfa sometidas a estrés hídrico. Tesis doctoral. Universidad de Navarra. España.



- Anyia AO, Herzog H (2004) Water-use-efficiency, leaf area and leaf gas exchange of cowpeas under mid-season drought. *European Journal of Agronomy*, 20: 327-339.
- Araus JL, Slafer GA, Reynolds MP, Royo MAJ (2002) Plant breeding and drought in C<sub>3</sub> cereals: what should we breed for? *Annals of Botany*, 89: 925-940.
- Arnon DI, Hoagland DR (1940) Crop production in artificial solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients. *Soil Science*, 50: 462-485.
- Arp WJ, van Mierlo JEM, Berendse F, Snijders W (1998) Interactions between elevated CO<sub>2</sub> concentration, nitrogen and water: effects on growth and water use of six perennial species. *Plant, Cell and Environment*, 21: 1-11.
- Aslam M, Huffaker RC, Travis RL (1973) The interaction of respiration and photosynthesis in induction of nitrate reductase activity. *Plant Physiology*, 52: 137-141.
- Assmann SM (1999) The cellular basis of guard cell sensing of rising CO<sub>2</sub>. *Plant, Cell and Environment*, 22: 629-637.
- Atkin OW, Schortemeyer M, McFarlane N, Evans JR (1999) The response of fast- and slow-growing *Acacia* species to elevated atmospheric CO<sub>2</sub>: and analysis of the underlying components of relative growth rate. *Oecologia*, 120: 544-554.
- Avice JC, Le Dily F, Goulas E, Noquet C, Meuriot F, Volenec JJ, Cunningham SM, Sors TG, Dhont C, Castonguay Y, Nadeau P, Bélanger G, Chalifour FP, Ourry A (2003) Vegetative storage proteins in overwintering storage organs of forage legumen: roles and regulation. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique*, 81: 1198-1212.
- Bacelar EA, Moutinho-Pereira JM, Gonçalves BC, Ferreira HF, Correia CM (2007) Changes in growth, gas exchange, xylem hydraulic properties and water use efficiency of three olive cultivars under contrasting water availability regimes. *Environmental and Experimental Botany*, 60: 183-192.
- Baker NR (ed.) (1996) *Photosynthesis and the environment*. Kluwer Academic Press. Dordrecht.
- Baker JT, Allen LHJ, Boote KJ, Pickering NB (1997) Rice responses to drought under carbon dioxide enrichment. 1. Growth and yield. *Global Change Biology*, 3: 119-128.

- Baker NR, Rosenqvist E (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*, 55: 1607-1621.
- Barceló J, Nicolás G, Sabater B, Sánchez R (1992) "Fisiología Vegetal". Ediciones Pirámide, S.A. Madrid.
- Barnes JD, Balaguer L, Manrique E, Elvira S, Davison AW (1992) A reappraisal of the use of dimethyl-sulphoxide for the extraction and determination of chlorophylls *a* and *b* in lichens and the higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 32: 85-100.
- Barnola JM, Raynaud D, Korotkevich YS, Lorius C (1987) Vostok ice core provides 160,000-year record of atmospheric CO<sub>2</sub>. *Nature*, 329: 408-414.
- Bassirirad H, Thomas RB, Reynolds JF, Strain BR (1996) Differential responses of root uptake kinetics of ammonium and nitrate to enriched atmospheric carbon dioxide concentration in field grown loblolly pine. *Plant, Cell and Environment*, 19: 367-371.
- Bassirirad H, Reynolds JF, Virginia RA, Brumelle MH (1997) Growth and root nitrate and phosphate uptake capacity of three desert species in response to atmospheric carbon dioxide enrichment. *Australian Journal of Plant Physiology*, 24: 353-358.
- Baxter R, Ashenden TW, Farrar J (1997) Effects of elevated carbon dioxide and nutrient status on growth, dry matter partitioning and nutrient content of *Poa alpina* var. *vivipara* L. *Journal of Experimental Botany*, 48: 1477-1486.
- Bazzaz FA, Fajer ED (1992) Plant life in a CO<sub>2</sub>-rich world. *Scientific American*, 266: 68-74.
- Benavides A (2002) "Ecofisiología y bioquímica del estrés en plantas". Dpto. de Horticultura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coah. México 25315.
- Bennett JM, Sinclair TR and Muchow RC (1987) Dependence of stomatal conductance on leaf water potential, turgor potential and relative water content in field soybean and maize. *Crop Science*, 27: 984-990.
- Bernacchi CJ, Portis AR, Nakano H, von Caemmerer S, Long SP (2002) Temperature response of mesophyll conductance. Implications for the determination of Rubisco enzymes kinetics and for limitations to photosynthesis *in vivo*. *Plant Physiology*, 130: 1992-1998.

- Berner RA (1998) The carbon cycle and CO<sub>2</sub> over Phanerozoic time: the role of land plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*, 353: 75-82.
- Bhattacharya NC, Hileman DR, Ghosh PP, Musser RL, Bhattacharya S, Biswas PK (1990) Interaction of enriched CO<sub>2</sub> and water-stress on the physiology of and biomass production in sweet-potato grown in open-top chambers. *Plant, Cell and Environment*, 13: 933-940.
- Bhatti KH, Raschid T, Chaudhary F (2000) Effect of drought stress on the yield, glutamine synthetase activity and protein contents in four varieties of tomato. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 3: 1772-1774.
- Bilger W, Björkman O (1990) Role of xanthophylls cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research*, 25: 173-185.
- Blaikie SJ, Chaco EK (1998) Sap flow, leaf exchange and chlorophyll fluorescence of container-grown cashew (*Anacardium occidentale* L.) trees subjected to repeated cycles of soil drying. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 38: 305–311.
- Blum A (1996) Crop response to drought and the interpretation of adaptation. *Plant Growth Regulation*, 20: 135-148.
- Bongi G, Loreto F (1989) Gas-exchange properties of salt stressed olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Physiology*, 90: 1408–1416.
- Bourgeais-Chaillou P, Pérez-Alfocea F, Guerrier G (1992) Compared effects of NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub> and NO<sub>3</sub>: NH<sub>4</sub> sources on growth and physiological responses of soybean exposed to NaCl stress. *Journal of Experimental Botany*, 43: 1225-1233.
- Boyer JS (1968) Relationship of water potential to growth of leaves. *Plant Physiology*, 43: 1056-1062.
- Boyer JS, Bowen BL (1970) Inhibition of oxygen evolution in chloroplasts isolated from leaves with low water potentials. *Plant Physiology*, 45: 612-615.
- Boyer JS (1970a) Differing sensitivity of photosynthesis to low leaf water potentials in corn and soybean. *Plant Physiology*, 46: 236-239.
- Boyer JS (1970b) Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean, and sunflower at various leaf water potentials. *Plant Physiology*, 46: 233-235.
- Boyer JS (1995) *Measuring the water status of plants and soils*. Academic Press. Nueva York.

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brodribb T (1996) Dynamics of changing intercellular CO<sub>2</sub> concentration (*C<sub>i</sub>*) during drought, determination of minimum functional *C<sub>i</sub>*. *Plant Physiology*, 111: 179-185.
- Buchanan BB, Gruissem W, Russell LJ (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*; p. 789. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
- Bunce JA (1996) Growth at elevated carbon dioxide concentration reduces hydraulic conductance in alfalfa and soybean. *Global Change Biology*, 2: 155-158.
- Bunce JA (1998) Effect of humidity on short-term responses of stomatal conductance to an increase in carbon dioxide concentration. *Plant, Cell and Environment*, 21: 115-120.
- Bunce JA, Ziska LH (1998) Decreased hydraulic conductance in plants at elevated carbon dioxide. *Plant, Cell and Environment*, 21: 121-126.
- Bunce JA (2000) Responses of stomatal conductance to light, humidity and temperature in winter wheat and barley grown at three concentrations of carbon dioxide in the field. *Global Change Biology*, 6: 371-382.
- Bunce JA (2001) Direct and acclimatory responses of stomatal conductance to elevated carbon dioxide in four herbaceous crop species in the field. *Global Change Biology*, 7: 323-331.
- Bunce JA, Sicher RC (2001) Water stress and day-to-day variation in apparent photosynthetic acclimation of field-grown soybeans to elevated carbon dioxide concentration. *Photosynthetica*, 39: 95-101.
- Burman U, Garg BK, Kathju S (2004) Interactive effects of thiourea and phosphorous on clusterbean under water stress. *Biologia Plantarum* 48: 61-65.
- Campbell BD, Stafford Smith DM, McKeon GM (1997) Elevated CO<sub>2</sub>, and water supply interactions in grasslands: a pastures and rangelands management perspective. *Global Change Biology*, 3: 177-187.
- Campbell WH (1999) Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. *Annual Review of Plant Physiology*, 50: 277-303.

- Cannell MGR, Dewar RC (1994) Carbon allocation in trees: a review of concepts for modelling. *Advances in Ecological Research*, 25: 60-140.
- Cardoso-Vilhena J, Barnes J (2001) Does nitrogen supply affect the response of wheat (*Triticum aestivum* cv. Hanno) to the combination of elevated CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>? *Journal of Experimental Botany*, 52: 1901-1911.
- Carter EB, Theodorou MK, Morris P (1997) Responses of *Lotus corniculatus* to environmental change: I. Effects of elevated CO<sub>2</sub>, temperature and drought on growth and plant development. *New Phytologist*, 136: 245-253.
- Castonguay Y, Markhart III AH (1991) Saturated rates of photosynthesis in water-stressed leaves of common bean and tepary bean. *Crop Science*, 31: 1605-1611.
- Catovsky S, Bazzaz FA (1999) Elevated CO<sub>2</sub> influences the responses of two birch species to soil moisture: implications for forest community structure. *Global Change Biology*, 5: 507-518.
- Centritto M, Lee HS, Jarvis PG (1999) Interactive effects of elevated [CO<sub>2</sub>] and drought on cherry (*Prunus avium*) seedlings. I. Growth, whole-plant water use efficiency and water loss. *New Phytologist*, 141: 129-140.
- Centritto M, Lucas ME, Jarvis PG (2002) Gas exchange, biomass, whole-plant water-use efficiency and water uptake of peach (*Prunus persica*) seedlings in response to elevated carbon dioxide concentration and water availability. *Tree Physiology*, 22: 699-706.
- Centritto M, Loreto F, Chartzoulakis K (2003) The use of low [CO<sub>2</sub>] to estimate diffusional and non-diffusional limitations of photosynthetic capacity of salt-stressed olive saplings. *Plant, Cell and Environment*, 26: 585-594.
- Centritto M (2005) Photosynthetic limitations, carbon partitioning in cherry in response to water deficit, elevated [CO<sub>2</sub>]. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 106: 233-242.
- Chaves MM, Pereira JS (1992) Water stress, CO<sub>2</sub> and climate change. *Journal of Experimental Botany*, 253: 1131-1139.
- Chaves M (2002) Water stress in the regulation of photosynthesis in the field. *Annals of Botany*, 89: 907-916.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS (2003) Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30: 239-264.

- Chou KH, Splittsoesser WE (1972) Glutamate dehydrogenase from pumpkin cotyledons: characterization and isozymes. *Plant Physiology*, 49: 550-554.
- Chu CC, Coleman JS, Mooney HA (1992) Control of biomass partitioning between roots and shoot: Atmospheric carbon dioxide enrichment and the acquisition and allocation of carbon and nitrogen in wild radish. *Oecologia*, 89: 580-587.
- Conroy J, Hocking P (1993) Nitrogen nutrition of C3 plants at elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations. *Physiologia Plantarum*, 89: 570-576.
- Cornic G, Le Gouallec JL, Briantais JM, Hodges M (1989) Effect of dehydration and high light on photosynthesis of two C3 plants. *Phaseolus vulgaris L.* and *Elastostema repens* (hour.) *Hort. Planta*, 177: 84-90.
- Cornic G (2000) Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture-not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science*, 5: 187-188.
- Cornic G, Fresneau C (2002) Photosynthetic carbon reduction, carbon oxidation cycles are the main electron sinks for photosystem II activity during a mild drought. *Annals of Botany*, 89: 887-894.
- Cousins AB, Adam NR, Wall GW, Kimball BA, Kryztoff G (2004) Photochemical energy use in *Sorghum* plants grown under drought and elevated CO<sub>2</sub>. PS2001 3.
- Cox JA, Conran JG (1996) The effect of water stress on the life cycles of *Erodium crinitum* Carolin and *Erodium cicutarium* (L.) L'Herit. Ex Aiton (*Geraniaceae*). *Australian Journal of Ecology*, 21: 235-240.
- Cure JD, Acock B (1986) Crop responses to carbon dioxide doubling: a literature survey. *Agricultural and Forest Meteorology*, 38: 127-145.
- Curtis PS, Vogel CS, Pregitzer KS, Zak DR, Teeri JA (1995) Interacting effects of soil fertility and atmospheric CO<sub>2</sub> on leaf area growth and carbon gain physiology in *Populus x eurameicana* (Dode) Guinier. *New Phytologist*, 129: 253-263.
- Curtis PS (1996) A meta-analysis of leaf gas exchange, nitrogen in trees grown under elevated carbon dioxide. *Plant, Cell and Environment*, 19: 127-137.
- Curtis PS, Wang X (1998) A meta-analysis of elevated CO<sub>2</sub> effects on woody plant mass, form and physiology. *Oecologia*, 113: 299-313.
- De Luis I, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz M (1999) Elevated CO<sub>2</sub> enhances plant growth in droughted N<sub>2</sub>-fixing alfalfa without improving water status. *Physiologia Plantarum*, 107: 84-89.

- de Souza AP, Gaspar M, Alves da Silva E, Ulian EC, Jaquiel Waclawovsky A, Yutaka Nishiyama MJr, Dos Santos RV, Menossi Teixeira M, Mendes Souza G, Silveira Buckeridge M (2008) Elevated CO<sub>2</sub> increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. *Plant, Cell and Environment*, 31: 1116-1127.
- Del Pozo A, Pérez P, Morcuende R, Alonso A, Martínez-Carrasco R (2005) Acclimatory responses of stomatal conductance, photosynthesis to elevated CO<sub>2</sub>, temperature in wheat crops grown at varying levels of N supply in a Mediterranean environment. *Plant Science*, 169: 908-916.
- Del Pozo A, Pérez P, Morcuende R, Gutiérrez D, Alonso A, Martínez-Carrasco R (2007a) Acclimation of photosynthesis and stomatal conductance to elevated CO<sub>2</sub> in canopy leaves of wheat at two nitrogen supplies. En: Buck HT, Nisi JE, Salomón N (eds.) "Wheat production in stressed environments; pp. 611-616". Springer.
- Del Pozo A, Pérez P, Gutiérrez D, Alonso A, Morcuende R, Martínez-Carrasco R (2007b) Gas Exchange acclimation to elevated CO<sub>2</sub> in upper-sunlit and lower-shaded canopy leaves in relation to nitrogen acquisition and partitioning in wheat Brown in field Chambers. *Environmental and Experimental Botany*, 59: 371-380.
- DeLucia EH, Hamilton JG, Naidu SL, Thomas RB, Andrews JA, Finzi A, Lavine M, Matamala R, Mohan JE, Hendrey GR, Schlesinger WH (1999) Net primary production of a forest ecosystem with experimental CO<sub>2</sub> enrichment. *Science*, 284: 1177-1179.
- Deng MD, Lamaze T, Morot-Gaudry JF (1989) A new experimental approach involving the simultaneous use of tungstate and ammonium for studying the physiological effects of the absence of nitrate reduction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 27: 689-696.
- Di Marco G, Manes F, Tricoli D, Vitale E (1990) Fluorescence parameters measured concurrently with net photosynthesis to investigate chloroplastic CO<sub>2</sub> concentration in leaves of *Quercus ilex* L. *Journal of Plant Physiology*, 136: 538-543.
- Díaz-Espejo A, Walcroft AS, Fernández JE, Hafidi B, Palomo MJ, Girón IF (2006) Modelling photosynthesis in olive leaves under drought conditions. *Tree Physiology*, 26: 1445-1456.

- Dichio B, Romano M, Nuzzo V, Xiloyannis C (2002) Soil water availability and relationship between canopy and roots in young olive trees (*cv coratina*). *Acta Horticulturae*, 586: 255-258.
- Dijkstra P, Lambers H (1989) A physiological analysis of genetic variation in relative growth rate within *Plantago major* L. *Functional Ecology*, 3: 577-587.
- Dirmeyer PA, Shukla J (1996) The effect on regional and global climate of expansion of the world's deserts. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*, 122: 451-482.
- Downton WJS, Loveys BR, Grant WJR (1988) Non-uniform stomatal closure induced by water stress causes putative non-stomatal inhibition of photosynthesis. *New Phytologist*, 110: 503-509.
- Drake BG, González-Meler MA, Long SP (1997) More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO<sub>2</sub>? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 609-639.
- Druta A (2001) Effect of long term exposure to high CO<sub>2</sub> concentrations on photosynthetic characteristics of *Prunus avium* L. plants. *Photosynthetica*, 39: 289-297.
- Dubbe DR, Farquhar GD, Raschke K (1978) Effect of abscisic acid on the gain of the feedback loop involving carbon dioxide, stomata. *Plant Physiology*, 62: 413-417.
- Duncan WG, Hesketh JD (1968) Net photosynthesis rates, relative leaf growth rates and numbers of 2 races of maize grown at eight temperatures. *Crop Science*, 8: 670-674.
- Dyckmans J, Flessa H (2002) Influence of tree internal nitrogen reserves on the response of beech (*Fagus sylvatica*) trees to elevated atmospheric carbon dioxide concentration. *Tree Physiology*, 22: 41-49.
- Eamus D, Jarvis PG (1989) The direct effects of increase in the global atmospheric CO<sub>2</sub> concentration on natural and commercial temperate trees and forests. *Advances in Ecological Research*, 19: 1-55.
- Eamus D (1991) The interaction of rising CO<sub>2</sub> and temperatures with water use efficiency. *Plant, Cell and Environment*, 14: 843-852.
- Eichelmann H, Oja V, Rasulov B, Padu E, Bichele I, Pettai H, Mols T, Kasparova I, Vapaavuori E, Laisk A (2004) Photosynthetic parameters of birch (*Betula*



- pendula* Roth) leaves growing in normal and in CO<sub>2</sub>- and O<sub>3</sub>-enriched atmospheres. *Plant, Cell and Environment*, 27: 479-495.
- El-Komy HM, Hamdia MA, El-Baki GKA (2003) Nitrate reductase in wheat plants grown under water stress and inoculated with *Azospirillum* spp. *Biologia Plantarum*, 46: 281-287.
- Ellsworth DS (1999) CO<sub>2</sub> enrichment in a maturing pine forest: are CO<sub>2</sub> exchange and water status in the canopy affected? *Plant, Cell and Environment*, 22: 461-472.
- Emmett B, Beier C, Estiarte M, Tietema A, Krestense HL, Williams D, Peñuelas J, Schimdt I, Sowerby A (2004) The response of soil processes to climate change: results from manipulation studies across an environmental gradient. *Ecosystems*, 7: 625-637.
- Epron D, Godard D, Cornic G, Genty B (1995) Limitation of net CO<sub>2</sub> assimilation rate by internal resistances to CO<sub>2</sub> transfer in the leaves of two tree species (*Fagus sylvatica* L. and *Castanea sativa* Mill.). *Plant, Cell and Environment*, 18: 43-51.
- Epron D (1997) Effects of drought on photosynthesis and on the thermotolerance of photosystem II in seedlings of cedar (*Cedrus atlantica* and *C. libani*). *Journal of Experimental Botany*, 48: 1835-1841.
- Erice G, Irigoyen JJ, Pérez P, Martínez-Carrasco R, Sánchez-Díaz M (2006) Effect of elevated CO<sub>2</sub>, temperature and drought on dry matter partitioning and photosynthesis before and after cutting of nodulated alfalfa. *Plant Science*, 170: 1059-1067.
- Erice G, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz M, Avicé JC, Ourry A (2007) Effect of drought, elevated CO<sub>2</sub> and temperature on accumulation of N and vegetative storage proteins (VSP) in taproot of nodulated alfalfa before and after cutting. *Plant Science*, 172: 903-912.
- Erice G, Louahlia S, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz M, Avicé JC (2010) Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *Journal of Plant Physiology*, 167: 114-120.
- Escalona JM, Flexas J, Medrano H (1999) Stomatal, non-stomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26: 421-433.
- Evans JR (1983) Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology*, 72: 297-302.

- Evans JR, Schortemeyer M, Mcfarlane N, Atkin OK (2000) Photosynthetic characteristics of 10 *Acacia* species grown under ambient and elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27: 13-25.
- Fangmeier A, Chrost B, Högy P, Krupinska K (2000) CO<sub>2</sub> enrichment enhances flag senescence in barley due to greater grain nitrogen sink capacity. *Journal of Experimental Botany*, 48: 1835-1841.
- Farage PK, Mckee IF, Long SP (1998) Does a low nitrogen supply necessarily lead to acclimation of photosynthesis to elevated CO<sub>2</sub>? *Plant Physiology*, 118: 573-80.
- Farooq U, Bano A (2006) Effect of abscisic acid and chlorocholine chloride on nodulation and biochemical content of *Vigna radiata* L. under water stress. *Pakistan Journal of Botany*, 38: 1511-1518.
- Farquhar GD, von Caemmerer CS, Berry J (1980) A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C3 species. *Planta*, 149: 78-90.
- Farquhar GD, Sharkey TD (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of plant physiology*, 33: 317-345.
- Fernández MD, Tezara W, Renfigo E, Herrera A (2002) Lack of downregulation of photosynthesis in a tropical root crop, cassava, grown under elevated CO<sub>2</sub> concentration. *Functional Plant Biology*, 29: 805-814.
- Ferrario-Méry S, Thibaud MC, Betsche T, Valadier MH, Foyer CH (1997) Modulation of carbon and nitrogen metabolism, and of nitrate reductase, in un-transformed and transformed *Nicotiana plumbaginifolia* during CO<sub>2</sub> enrichment of plants grown in pots and in hydroponic culture. *Planta*, 202: 510-521.
- Ferrario-Méry S, Valadier MH, Foyer CH (1998) Overexpression of nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA. *Plant Physiology*, 117: 293-302.
- Ferris R, Taylor G (1994) Increased root growth in elevated CO<sub>2</sub>: a biophysical analysis of root cell elongation. *Journal of Experimental Botany*, 280: 1603-1612.
- Ferris R, Wheeler TR, Hadley P, Ellis RH (1998) Recovery of photosynthesis after environmental stress in soybean grown under elevated CO<sub>2</sub>. *Crop Science*, 38: 948-955.
- Field CB, Jackson RB, Mooney HA (1995) Stomatal responses to increased CO<sub>2</sub>-implications from the plant to the global scale. *Plant, Cell and Environment*, 18: 1214-1225.

- Flagella Z, Pastore D, Campanile RG, Di Fonzo N (1994) Photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and drought tolerance in different durum wheat (*Triticum durum*) cultivars. *Journal of Agricultural Science*, 122: 183-192.
- Fleisher DH, Timlin DJ, Reddy VR (2008) Elevated carbon dioxide and water stress effects on potato canopy gas exchange, water use, and productivity. *Agricultural and Forest Meteorology*, 148: 1109-1122.
- Flexas J, Escalona JM, Medrano H (1998) Down-regulation of photosynthesis by drought under field conditions in grapevines leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, 25: 893-900.
- Flexas J, Bota J, Escalona JM, Sampol B, Medrano H (2002) Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Functional and Plant Biology*, 29: 461-471.
- Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G, Sharkey TD (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology*, 6: 269-279.
- Flexas J, Diaz-Espejo A, Galmés J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbó M (2007) Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO<sub>2</sub> concentration around leaves. *Plant, Cell and Environment*, 30: 1284–1298.
- Flexas J, Ribas-Carbó M, Díaz-Espejo A, Galmés J, Medrano H (2008) Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>: current knowledge and future prospects. *Plant, Cell and Environment*, 31: 602-621.
- Flowers MD, Fiscus EL, Burkey KO, Booker FL, Dubois JJB (2007) Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and yield of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes differing insensitivity to ozone. *Environmental and Experimental Botany*, 61: 190–198.
- Ford MA, Thorne GN (1967) Effect of CO<sub>2</sub> concentration on growth of sugar-beet, barley, kale and maize. *Annals of Botany*, 31: 629-644.
- Foyer CH, Valadier MH, Migge A, Becker TW (1998) Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiology*, 117: 283-292.
- French RJ, Turner NC (1991) Water deficit change dry matter partitioning and seed yield in narrow-leafed lupins (*Lupinus angustifolius* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 42: 471-484.

- Galmés J, Cifre J, Medrano H, Flexas J (2005) Modulation of relative growth rate and its components by water stress in Mediterranean species with different growth forms. *Oecologia*, 145: 21-31.
- Garbutt K, Williams WE, Bazzaz FA (1990) Analysis of the differential response of five annuals to elevated CO<sub>2</sub> during growth. *Ecology*, 71:1185-1194.
- Gavazzi M, Seiler M, Aust W, Zedaker S (2000) The influence of elevated carbon dioxide and water availability on herbaceous weed development and growth of transplanted loblolly pine (*Pinus taeda*). *Environmental and Experimental Botany*, 44: 185-194.
- Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Harnecker J, Schulze ED, Ludewig F, Sonnewald U, Scheible WD, Stitt M (1998) Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants, and a large stimulation of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. *Plant, Cell and Environment*, 21: 253-268.
- Geiger M, Haake V, Ludewig F, Sonnewald U, Stitt M. (1999) The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant, Cell and Environment*, 22: 1177-1199.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochemical and Biophysical Acta*, 990: 87-92.
- Ghannoum O, von Caemmerer S, Ziska LH, Conroy JP (2000) The growth response of C<sub>4</sub> plants to rising atmospheric CO<sub>2</sub> partial pressure: A reassessment. *Plant Cell and Environment*, 23: 931-941.
- Ghosh SC, Asanuma K, Kusutani K, Toyota M (2000) Effects of moisture stress at different growth stages on the amount of total non-structural carbohydrate, nitrate reductase activity and yield of potato. *Japanese Journal of Tropical Agriculture*, 44: 158-166.
- Giorio P, Sorrentino G, d'Andria R (1999) Stomatal behaviour leaf water status and photosynthetic response in field-grown olive trees under water deficit. *Environmental and Experimental Botany*, 42: 95-104.
- Givan CV, Joy KW, Kleczkowski LA (1988) A decade of photorespiratory, nitrogen cycling. *Trends in Biochemical Science*, 13: 433-437.

- Glevarec G, Bouton S, Jaspard E, Riou MT, Cliquet JB, Suzuki A, Limami A (2004) Respective roles of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase in ammonium and amino acid metabolism during germination and post-germinative growth in the model legume *Medicago truncatula*. *Planta*, 219: 286-297.
- González-Moro B, Lacuesta M, Royuela M, Muñoz-Rueda A, González-Murua C, (1993) Comparative study on the inhibition of photosynthesis caused by aminooxyacetic acid and phosphinothricin in *Zea mays*. *Journal of Plant Physiology*, 142: 161-166.
- González-Moro B, Loureiro-Beldarrain I, Estavillo JM, Duñabeitia MK, Muñoz-Rueda A, Gonzalez-Murua C (2003) Effect of photorespiratory C<sub>2</sub> acids on CO<sub>2</sub> assimilation, PS II photochemistry and the xanthophyll cycle in maize. *Photosynthesis Research*, 78: 161-173.
- Grossman-Clarke S, Pinter PJJr, Kartschall T, Kimball BA, Hunsaker DJ, Wall GW, García RL, LaMorte RL (2001) Modelling a spring wheat crop under elevated CO<sub>2</sub> and drought. *New Phytologist*, 150: 315-335.
- Gutiérrez D, Gutiérrez E, Pérez P, Morcuende R, Verdejo AL, Martínez-Carrasco R (2009) Acclimation to future atmospheric CO<sub>2</sub> levels increases photochemical efficiency and mitigates photochemistry inhibition by warm temperatures in wheat under field chambers. *Physiologia Plantarum*, 137: 86-100.
- Habash DZ, Paul MJ, Parry MAJ, Keys AJ, Lawlor DW (1995) Increased capacity for photosynthesis in wheat grown at elevated CO<sub>2</sub>: the relationship between electron transport, carbon metabolism. *Planta*, 197: 482-489.
- Hageman RH, Reed AJ (1980) Nitrate reductase from higher plants. *Methods in Enzymology*, 69: 270-280.
- Hamblin A, Tennant D, Parry MW (1990) The cost of stress: Dry matter partitioning changes with seasonal supply of water and nitrogen to dryland wheat. *Plant Soil*, 122: 47-58.
- Harley PC, Sharkey TD (1991) An improved model of C<sub>3</sub> photosynthesis at high CO<sub>2</sub>. Reverses O<sub>2</sub> sensitivity explained by lack of glycerate re-entry into the chloroplast. *Photosynthesis Research*, 27: 169-178.
- Harley PC, Thomas RB, Reynolds JF, Strain BR (1992) Modelling photosynthesis of cotton grown in elevated CO<sub>2</sub>. *Plant, Cell and Environment*, 15: 271-281.

- Havaux M, Ernez M, Lannoye R (1988) Correlation between heat tolerance and drought tolerance in cereals demonstrated by rapid chlorophyll fluorescence tests. *Journal of Plant Physiology*, 133: 555-560.
- Hay KMH, Walker AJ (1989) Environmental effects on photosynthesis: water stress. En: Hay KMH, Walkers AJ (eds.) "An introduction to the physiology of crop yield. Photosynthesis efficiency: photosynthesis and respiration; pp. 68-76". Longman Scientific Technical Wiley, New York.
- Heineke D, Kauder F, Frommer W, Kühn C, Gillissen B, Ludewig F, Sonnewald D (1999) Application of transgenic plants in understanding responses to atmospheric change. *Plant, Cell and Environment Special Edition*, 22: 623-628.
- Heinemann AB, Maia AHN, Dourado-Neto D, Ingram KT, Hoogenboom G (2006) Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) growth and development response to CO<sub>2</sub> enrichment under different temperature regimes. *European Journal of Agronomy*, 24: 52-61.
- Hetherington AM (2001) Guard cell signalling. *Cell*, 107: 711-714.
- Hibberd JM, Richardson P, Whitbread R, Farrar JF (1996) Effects of leaf age, basal meristem and infection with powdery mildew on photosynthesis in barley grown in 700  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  CO<sub>2</sub>. *New Phytologist*, 134: 317-325.
- Hirel B, Andrieu B, Valadier MH, Renard S, Quilleré I, Chelle M, Pommel B, Fournier C, Drouet JL (2005) Physiology of maize. II: Identification of physiological markers representative of the nitrogen status of maize (*Zea mays*) leaves during grain filling. *Physiologia Plantarum*, 124: 178-188.
- Hocking PJ, Meyer CP (1991a) Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and nitrogen stress on grown and partitioning of dry matter and nitrogen in wheat and maize. *Australian Journal of Plant Physiology*, 18: 339-356.
- Hocking PJ, Meyer CP (1991b) Carbon dioxide enrichment decreases critical nitrate and nitrogen concentrations in wheat. *Journal of Plant Nutrition*, 14: 571-584.
- Hodges M (2002) Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. *Journal of Experimental Botany*, 53: 905-916.
- Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Nogueir M, van der Linden PJ, Dray X, Maskell K, Johnson CA, eds. (2001) "Climate Change: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I in the Third Assessment Report of Intergovernmental Panel on Climate Change; pp. 251". Cambridge University Press, Cambridge.

- Houghton JT, Jenkins GJ, Ephraim JJ (1990) *Climate Change: The IPCC Scientific Assessment*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hrubec TC, Robinson JM, Donaldson RP (1985) Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and carbohydrate content on the dark respiration of soybeans. *Plant Physiology*, 79: 684-689.
- Hsiao TC (1973) Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology*, 24: 519-570.
- Hsiao TC (1993) Effects of drought and elevated CO<sub>2</sub> on plant water use efficiency and productivity. En: Jackson MB, Black CR (eds.) "Interacting Stresses on Plants in a changing climate; pp. 435-465". Springer, Berlin.
- Hsu SY, Hsu YT, Kao CH (2003) Ammonium ion, ethylene, and abscisic acid in polyethylene glycol-treated rice leaves. *Biologia Plantarum*, 46: 239-242.
- Huber SC, Kaiser WM (1996) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside activates nitrate reductase in darkened spinach and pea. *Physiologia Plantarum*, 98: 833-837.
- Hughes L (2000) Biological consequences of global warming: is the signal already here? *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 56-61.
- Hui DF, Luo YQ, Chen WX, Coleman JS, Johnson DW, Sims DA (2001) Canopy radiation and water-use-efficiencies as effected by elevated [CO<sub>2</sub>]. *Global Change Biology*, 7: 75-91.
- Hulme B, Alfano MJ, Arnell NW (1999) Relative impacts of human-induced climate change and natural climate variability. *Nature*, 397: 688-691.
- Hymus GJ, Baker NR, Long SP (2001) Growth in elevated CO<sub>2</sub> can both increase and decrease photochemistry and photoinhibition of photosynthesis in a predictable manner. *Dactylis glomerata* grown in two levels of nitrogen nutrition. *Plant Physiology*, 127: 1204-1211.
- Ingvarsdén C, Veierskov B (1994) Response of young barley plants to CO<sub>2</sub> enrichment. *Journal of Experimental Botany*, 45: 1373-1378.
- IPCC (2001) *Climate change 2001: the scientific basis*. En: Houghton JT, Ding Y, Griggs J, Noguer M, Van der Linden PJ, Dai X, Maskell K, Johnson CA (eds.) "Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel of Climate Change". Cambridge University Press, Cambridge.

- IPPC (2007) Climate change 2007: impacts, adaptation and vulnerability working group II contribution to the Intergovernmental Panel on Climate Change. Fourth Assessment Report. Summary for Policymakers, Brussels.
- Jackson RB, Reynolds HL (1996) Nitrate and ammonium uptake for single and mixed-species communities grown at elevated carbon dioxide. *Oecologia*, 105: 74-80.
- Jacob J, Lawlor DW (1991) Stomatal and mesophyll limitations of photosynthesis in phosphate deficient sunflower, maize and wheat plants. *Journal of Experimental Botany*, 42: 1003-1011.
- Jauhainen J, Silvola J (1996) The effect of elevated CO<sub>2</sub> concentration on photosynthesis of *Sphagnum fuscum*. En: Laiho R, Laine J, Vasander H (eds.) pp. 23-29. Academy of Finland, Helsinki.
- Jeffries RA (1994) Drought and chlorophyll fluorescence in field-grown potato (*Solanum tuberosum*). *Physiologia Plantarum*, 90: 93-97.
- Johnson JD, Tognetti R, Paris P (2002) Water relations and gas exchange in poplar and willow under water stress and elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. *Physiologia Plantarum*, 115: 93-100.
- Jolliffe PA, Ehret DL (1985) Growth of bean plants at elevated carbon dioxide concentrations. *Canadian Journal of Botany-Reveu Canadienne de Botanique*, 63: 2021-2025.
- Jones HG (1973) Moderate-term water stresses and associated changes in some photosynthetic parameters in cotton. *New Phytologist*, 72: 1095-1105.
- Jones HG (1985) Adaptive significance of leaf development and structural responses to environment. En: Baker NR, Davies WJ, Ong CK (eds.) "Control of leaf Growth; pp. 155-173". Cambridge University Press, Cambridge.
- Jones P, Jones JW, Allen LHJ (1985) Seasonal carbon and water balances of soybeans grown under stress treatments in sunlit chambers. *Transactions of the ASAE*, 28: 2021-2028.
- Kaiser WM (1987) Effect of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum*, 71: 141-142.
- Kaiser WM, Foster J (1989) Low CO<sub>2</sub> prevents nitrate reduction in leaves. *Plant Physiology*, 91: 970-974.
- Kaiser WM, Brendle-Behnisch E (1991) Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase activity by photosynthesis. I. Modulation *in vivo* by CO<sub>2</sub> availability. *Plant Physiology*, 96: 363-367.



- Kaiser WM, Man H, Kandlbinder A, Glaab J, Weiner H (2000a) Nitrate reductase in higher plants: post-translational regulation and comparison of rates of nitrate reduction *in vivo* and of nitrate reductase activity *in vitro*. En: Martins-Loução MA, Lips SH (eds.) "Nitrogen in a sustainable ecosystem: from the cell to the plant; pp: 103-110". Backhuys Publishers, Leiden. The Netherlands.
- Kaiser WM, Kandlbinder A, Stoimenova M, Glaab J (2000b) Discrepancy between nitrate reduction rates in intact leaves and nitrate reductase activity in leaf extracts: GAT limits nitrate reduction *in situ*? *Planta*, 210: 801-807.
- Kathju S, Vyas SP, Garg BK, Lahiri AN (1990) Fertility induced improvements in performance and metabolism of wheat under different intensities of water stress. En: Sinha SK, Sane PB, Bhargava SC, Aggarwal PK (eds.) "Proceedings of the International Congress of Plant Physiology; Vol.II, pp. 854- 858". The Society for Plant Physiology and Biochemistry. New Delhi, India.
- Keck RW, Boyer JS (1974) Chloroplast response to leaf water potential. III. Differing inhibition of electron transport and photophosphorylation. *Plant Physiology*, 53: 474-479.
- Kellomäki S, Wang KY (1996) Photosynthetic responses to needle water potential in Scots pine after a four-year exposure to elevated CO<sub>2</sub>, temperature. *Tree Physiology*, 16: 765-772.
- Keutgen N, Chen K (2001) Responses of citrus leaf photosynthesis, chlorophyll fluorescence, macronutrient and carbohydrate contents to elevated CO<sub>2</sub>. *Journal of Plant Physiology*, 158: 1307-1316.
- Keys AJ, Bird IF, Cornelius MJ, Lea PJ, Wallsgrave RM, Mifflin BJ (1978) Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature*, 275: 741-743.
- Kimball BA (1983) Carbon dioxide and agricultural yield: An assemblage and analysis of 430 prior observations. *Agronomy Journal*, 75: 779-788.
- Kimball BA, Pinter PJ, García RL, LaMorte RL, Wall GW, Hunsaker DJ, Weschung G, Weschung F, Kartschall T (1995) Productivity and water use of wheat under free-air carbon dioxide enrichment. *Global Change Biology*, 1: 429-442.
- Kimball BA, Morris CF, Pinter PJJr, Wall GW, Hunsaker DJ, Adamsen FJ, LaMorte RL, Leavitt SW, Thompson TL, Matthias AD, Brooks TJ (2001) Elevated CO<sub>2</sub>, drought and soil nitrogen effects on wheat grain quality. *New Phytologist*, 150: 295-303.

- Kimball BA, Kobayashi K, Bindi M (2002) Responses of agricultural crops to free-air CO<sub>2</sub> enrichment. *Advances in Agronomy*, 77: 293-368.
- Kinsman E-A, Lewis C, Davies MS, Young JE, Francis D, Thomas ID, Chorlton KH, Ougham HJ (1997) Effects of temperature and elevated CO<sub>2</sub> on cell division in shoot meristems: Differential responses of two natural populations of *Dactylis glomerata* L. *Plant, Cell and Environment*, 19: 775-780.
- Kleemola J, Peltonen J, Peltone-Sinio P (1994) Apical development and growth of barley under different CO<sub>2</sub> and nitrogen regimes. *Journal of Agronomy and Crop Science-Zeitschrift für Acker und Pflanzenbau*, 173: 79-92.
- Körner C (1995) Biodiversity and CO<sub>2</sub>: global change is under way. *GAIA*, 4: 234-243.
- Körner C (2000) Biosphere responses to CO<sub>2</sub> enrichment. *Ecological Applications*, 10: 1590-1619.
- Krček M, Slamka P, Olšovská K, Brestič M, Benčíková M (2008) Reduction of drought stress effect in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) by nitrogen fertilization. *Plant Soil Environment*, 54: 7-13.
- Kriedemann PE, Sward RJ, Downton JS (1976) Vine response to carbon dioxide enrichment during heat therapy. *Australian Journal of Plant Physiology*, 3: 605-618.
- Kurasová I, Kalina J, Stroch M, Urban O, Spunda V (2003a) Response of photosynthetic apparatus of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) to combined effect of elevated CO<sub>2</sub> concentration and different growth irradiance. *Photosynthetica*, 41: 209-219.
- Kurosová I, Kalina J, Urban O, Sttroch M, Spunda V (2003b) Acclimation of two distinct plant species, spring barley and Norway spruce, to combined effect of various irradiance and CO<sub>2</sub> concentration during cultivation in controlled environment. *Photosynthetica*, 41: 513-523.
- Lacuesta M, González-Moro B, González-Murua C, Aparicio-Tejo P, Muñoz-Rueda A (1989) Effect of phosphinothricin (Glufosinate) on activities of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in *Medicago sativa* L. *Journal of Plant Physiology*, 134: 304-307.
- Lacuesta M, Gonzalez-Moro MB, González-Murua C, Muñoz-Rueda A (1990) Temporal study of the effect of phosphinothricin on the activity of glutamine synthetase, glutamate dehydrogenase and nitrate reductase in *Medicago sativa* L. *Journal of Plant Physiology*, 136: 410-414.

- Lacuesta M (1992) Estudio de la interacción del metabolismo del carbono y del nitrógeno en plantas C<sub>3</sub>. Efecto de la fosfinitricina (PPT). Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco/EHU. España.
- Lam HM, Coschigano KT, Oliviera IC, Melo-Oliviera R, Coruzzi GM (1996) The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 569–593.
- Lambers H, Freijssen N, Poorter H, Hirose T, van der Werf A (1990) Analyses of growth based on net assimilation rate and nitrogen productivity. Their physiological background. En: Lambers H, Cambridge ML, Konings H, Pons TL (eds.) “Causes and Consequences of Variation in Growth Rate and Productivity of Higher Plants; pp. 1-17”. SPB Academic Publishing bv, The Hague. The Netherlands.
- 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.
- Lambers H, Chapin III FS, Poole I (1998) *Plant physiological ecology*. p. 540. Springer-Verlag, New York.
- Lancien M, Gadal P, Hodges M (2000) Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonia assimilation. *Plant Physiology*, 123: 817-824.
- Larigauderie A, Reynolds JF, Strain BR (1994) Root response to carbon dioxide enrichment and nitrogen supply in loblolly pine. *Plant and Soil*, 165: 21-32.
- Larios B, Agüera E, de la Haba P, Pérez-Vicente R, Maldonado JM (2001) A short-term exposure of cucumber plants to rising atmospheric CO<sub>2</sub> increases leaf carbohydrate content and enhances nitrate reductase expression and activity. *Planta*, 212: 305-312.
- Larios B, Agüera E, Cabello P, Maldonado JM, de la Haba P (2004) The rate of CO<sub>2</sub> assimilation controls the expression and activity of glutamine synthetase through sugar formation in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves. *Journal of Experimental Botany*, 55: 69-75.
- Laurière C, Daussant J (1983) Identification of the ammonium-dependent isoenzyme of glutamate dehydrogenase as a form induced by senescence or darkness stress in the first leaf of wheat. *Plant Physiology*, 58: 89-92.

- Lawlor DW, Fock H (1977) Water stress induced changes in the amounts of photosynthetic assimilation products and respiratory metabolites of sunflower leaves. *Journal of Experimental Botany*, 28: 329-337.
- Lawlor DW, Mitchell RAC (1991) The effects of increasing CO<sub>2</sub> on crop photosynthesis, productivity: a review of field studies. *Plant, Cell and Environment*, 14: 807-818.
- Lawlor DW (2002) Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: Stomata vs. Metabolism, the role of ATP. *Annals of Botany*, 89: 871-885.
- Lawlor DW, Cornic G (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell and Environment*, 25: 275-294.
- Lea PJ, Joy KW, Ramos JL, Guerrero MG (1984) The action of 2-amino-4-(methylphosphinyl)-butanoic acid (phosphinothricin) and its 2-oxoderivative on the metabolism of cyanobacteria and higher plants. *Phytochemistry*, 23: 1-6.
- Lea PJ, Mifflin BJ (2003) Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41: 555-564.
- Leakey ADB, Bernacchi CJ, Ort DR, Long SP (2006) Long-term growth of soybean at elevated [CO<sub>2</sub>] does not cause acclimation of stomatal conductance under fully open-air conditions. *Plant, Cell, Environment*, 29: 1794-1800.
- Lee EH, Pausch RC, Rowland RA, Mulchi CL, Rudorff BFT (1997) Responses of field-grown soybean (*cv. Essex*) to elevated SO<sub>2</sub> under two atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations. *Environmental and Experimental Botany*, 37: 85-93.
- Liao JX, Wang GX (2002) Effects of CO<sub>2</sub> levels and the fecundity of forest trees. *Science*, 292: 95-98.
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 47: 239-247.
- Liu F, Stützel H (2002a) Leaf water relations of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.) in response to soil drying. *European Journal of Agronomy*, 16: 137-150.
- Liu F, Stützel H (2002b) Leaf expansion, stomatal conductance, and transpiration of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.) in response to soil drying. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 127: 878-883.

- Liu F, Stützel H (2004) Biomass partitioning, specific leaf area, and water use efficiency of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.) in response to water stress. *Scientia Horticulturae*, 102: 15-27.
- Llorens L, Peñuelas J, Estiarte M (2003) Ecophysiological responses of two Mediterranean shrubs, *Erica multiflora* and *Globularia alypum*, to experimentally drier and warmer conditions. *Physiologia Plantarum*, 119: 231-243.
- Lodge RJ, Dijkstra P, Drake BG, Morison JIL (2001) Stomatal acclimation to increased CO<sub>2</sub> concentration in Florida Scrub oak species *Quercus myrifolia* Wild. *Plant, Cell Environment*, 24: 77-88.
- Loewe A, Einig W, Shi L, Dizengremel P, Hampp R (2000) Mycorrhiza formation and elevated CO<sub>2</sub> both increase the capacity for sucrose synthesis in source leaves of spruce and aspen. *New Phytologist*, 145: 565-574.
- Long SP, Drake BG (1991) Effect of long-term elevation of CO<sub>2</sub> concentration in the field on the quantum yield of photosynthesis of the C<sub>3</sub> sedge, *Scirpus olneyi*. *Plant Physiology*, 96: 221-226.
- Long SP, Drake BG (1992) Photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation, rising atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations. En: Baker NR, Thomas H (eds.) "Crop Photosynthesis: Spatial, Temporal Determinations; pp. 69-103". Elsevier Science. New York.
- Long SP, Baker NP, Raines CA (1993) Analysing the response of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation to long-term elevation of atmospheric CO<sub>2</sub> concentration. *Vegetatio*, 104/105: 33-45.
- Long SP, Ainsworth EA, Rogers A, Ort DR (2004) Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 591-628.
- Lopes MS, Nogués S, Araus JL (2004) Nitrogen source and water regime effects on barley photosynthesis and isotope signature. *Functional and Plant Biology*, 31: 995-1003.
- López Bellido L (1991) Cereales. En: *Cultivos Herbáceos*, vol. 1. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Loreto F, Harley PC, Di Marco G, Sharkey TD (1992) Estimation of mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> flux by three different methods. *Plant Physiology*, 98: 1437-1443.
- Loreto F, Tricoli D, Di Marco G (1995) On the relationship between electron transport rate and photosynthesis in leaves of the C<sub>4</sub> plant *Sorghum bicolor* exposed to

- water stress, temperature changes and carbon metabolism inhibition. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 885-892.
- Loyola-Vargas VM, Sánchez-Jiménez E (1984) Differential role of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism of maize tissues. *Plant Physiology*, 76: 536-540.
- Lu C, Zhang J (1999) Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *Journal of Experimental Botany*, 50: 1199-1206.
- Ludlow MM, Chu ACP, Clements RJ, Kerslake RG (1983) Adaptation of species of *Centrosema* to water stress. *Australian Journal of Plant Physiology*, 10: 119-130.
- Luo Y, Mooney HA (1999) Carbon dioxide and environmental stress. Academic Press, San Diego, 415.
- Madson E (1968) Effect of CO<sub>2</sub> concentration on the accumulation of starch and sugar in tomato leaves. *Physiologia Plantarum*, 21: 168-175.
- Maevskaya SN, Andreeva TF, Voedudskaya SYU, Cherkanova S (1990) Effect of high carbon dioxide concentration on photosynthesis and nitrogen metabolism in leaf mustard plants. *Fiziologia Rastenii*, 37: 921-927.
- Maherali H, Reid CD, Polley HW, Johnson HB, Jackson RB (2002) Stomatal acclimation over a subambient to elevated CO<sub>2</sub> gradient in a C3/C4 grassland. *Plant, Cell and Environment*, 25: 557-566.
- Makino A, Osmond B (1991) Effects of nitrogen nutrition on pea and wheat. *Plant Physiology*, 96: 355-362.
- Makino A, Mae T (1999) Photosynthesis and plant growth at elevated levels of CO<sub>2</sub>. *Plant and Cell Physiology*, 40: 999-1006.
- Makino A, Harada M, Kaneko K, Mae T, Shimada T, Yamamoto N (2000) Whole plant growth and N allocation in transgenic rice plants with decreased content of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase under different CO<sub>2</sub> partial pressures. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27: 1-12.
- Manderscheid R, Weigel HJ (1995) Do increasing atmospheric concentrations contribute to yield increases of German crops?. *Journal of Agronomy Crop Science*, 175: 73-82.
- Mann AF, Fenmtem PA, Stewart GR (1979) Identification of two forms of glutamine syntetase in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 88: 515-521.

- Mao ZJ, Wang YJ, Zhu YG, Wang XW, Sun YF, Zhou BO, Voronin PY (2005) Prolonged growth of young spruce (*Picea koraiensis* Nakai) plants at double atmospheric CO<sub>2</sub> concentration stimulates the preferential growth of thick roots. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52: 659-663.
- Marcelis LFM, Heuvelink E, Goudraan J (1998) Modelling biomass production and yield of horticultural crops: a review. *Scientia Horticulturae*, 74: 83-111.
- Markhart AH III (1985) Comparative water relations of *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus acutifolius* Gray. *Plant Physiology*, 77: 113-117.
- Marler TE, Mickelbart MV (1998) Drought, leaf gas exchange, and chlorophyll fluorescence of field-grown papaya. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 123: 714-718.
- Maroco JP, Edwards GE, Ku MSB (1999) Photosynthetic acclimation of maize to growth under elevated levels of carbon dioxide. *Planta*, 210: 115-125.
- Maroco JP, Pereira JS, Chaves MM (2000) Growth, photosynthesis and water-use efficiency of two C<sub>4</sub> Sahelian grasses subjected to water deficits. *Journal of Arid Environments*, 45: 119-137.
- Marques da Silva J, Arrabaca MC (2004) Photosynthesis in the water stressed C<sub>4</sub> grass *Setaria sphacelata* is mainly limited by stomata with both rapidly and slowly imposed water deficits. *Physiologia Plantarum*, 121: 409-420.
- Martin F, Winspear MJ, McFarlane JD, Oaks A (1983) Effect of methioninesulphoximine on the accumulation of ammonia in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> leaves. *Plant Physiology*, 71: 177-181.
- Martin PJ, Stephens W (2006) Willow growth in response to nutrients and moisture on a clay landfill cap soil. I. Growth and biomass production. *Bioresource Technology*, 97: 437-448.
- Masle J, Hudson GS, Badger M (1993) Effects of ambient carbon dioxide concentrations on growth and nitrogen use in tobacco plants transformed with an antisense gene to the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Plant Physiology*, 103: 1075-1088.
- Massacci A, Jones HG (1990) Use of simultaneous analysis of gas-exchange and chlorophyll fluorescence quenching for analysing the effects of water stress on photosynthesis in apple leaves. *Trees*, 4: 1-8.
- Matt P, Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Krapp A, Stitt M (2001) The immediate cause of the diurnal changes of nitrogen metabolism in leaves of nitrate-replete

- tobacco: a major imbalance between the rate of nitrate reduction and the rates of nitrate uptake and ammonium metabolism during the first part of the light period. *Plant, Cell and Environment*, 24: 177-190.
- Matt P, Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Krapp A, Stitt M (2001) Elevated carbon dioxide increases nitrate uptake and nitrate reductase activity when tobacco is growing on nitrate, but increases ammonium uptake and inhibits nitrate reductase activity when tobacco is growing on ammonium nitrate. *Plant, Cell and Environment*, 24: 1119-1137.
- McCarthy JJ, Canziani OF, Leary NA, Dokken DJ, White KS (2001) *Climate Change 2001: impacts, adaptation, and vulnerability*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Mc Donald MS (2003) *Photobiology of higher plants*; p. 131. Wiley. Chichester, England.
- McKay HM (1992) Electrolyte leakage from fine roots of conifer seedlings: A rapid index of plant vitality following cold storage. *Canadian Journal of Forest Research*, 22: 1371-1377.
- McNally S, Hirel B, Stewart GR (1983) Nitrogen metabolism in halophytes V. The occurrence of multiple forms of glutamine synthetase in leaf tissue. *New Phytologist*, 94: 47-56.
- Medrano H, Parry MAJ, Socias X, Lawlor DW (1997) Long term water stress inactivates Rubisco in subterranean clover. *Annals of Applied Biology*, 131: 491-501.
- Medrano H, Flexas J (2002) Fijación del dióxido de carbono y biosíntesis de fotoasimilados. En: Azcón Bieto J, Talón M (eds.) "Fundamentos de Fisiología Vegetal"; pp. 173-185". McGraw-Hill Interamericana. Madrid.
- Mena-Petite A, Ortega-Lasuen U, González-Moro B, Lacuesta M, Muñoz-Rueda A (2001) Storage duration and temperature effect on the functional integrity of container and bare-root *Pinus radiata* D. Don stock-types. *Trees*, 15: 289-296.
- Mena-Petite A, Muñoz-Rueda A, Lacuesta M (2005) Effect of cold storage treatments and transplanting stress on gas exchange, chlorophyll fluorescence and survival under water limiting conditions of *Pinus radiata* stock-types. *European Journal of Forest Research*, 124: 73-82.
- Mena-Petite A, Lacuesta M, Muñoz-Rueda A (2006) Ammonium assimilation in *Pinus radiata* seedlings: effects of storage treatments, transplanting stress and water



- regimes after planting under simulated field conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 55: 1-14.
- Méthy M, Damesin C, Rambal S (1996) Drought and photosystem II activity in two Mediterranean oaks. *Annales Sciences Forestières*, 53: 255–262.
- Mifflin B, Lea P (1976) The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry*, 15: 875-885.
- Mifflin B, Lea P (1980) Changes in glutamate dehydrogenase activity of *Clamydomonas reinhardtii* under different trophic and stress conditions. *Plant, Cell and Environment*, 12: 173-182.
- Mifflin BJ, Habash DZ (2002) The role of glutamine synthase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement of nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany*, 53: 979-987.
- Migge A, Carroyol E, Kunz C, Hirel B, Fock H, Becker T (1997) The expression of the tobacco genes encoding plastidic glutamine synthetase or ferredoxin-dependent glutamate synthase does not depend on the rate of nitrate reduction, and is unaffected by suppression of photorespiration. *Journal of Experimental Botany*, 48: 1175-1184.
- Miller AJ, Cramer MD (2004) Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil*, 274: 1-36.
- Mohammadkhani N, Heidari R (2008) Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties. *Turkish Journal of Biology*, 32: 23-30.
- Morison JIL, Gifford RM (1984) Plant Growth and water use with limited water supply in high CO<sub>2</sub> concentrations. I. Leaf area, water use and transpiration. *Australian Journal of Plant Physiology*, 11: 361-374.
- Molnár I, Gáspár L, Sárvári E, Dulai S, Hoffmann B, Molnár-Láng M, Galiba G (2004) Physiological and morphological responses to water stress in *Aegilops biuncialis* and *Triticum aestivum* genotypes with differing tolerance to drought. *Functional Plant Biology*, 31: 1149-1159.
- Morison JIL (1985) Sensitivity of stomata, water use efficiency to high CO<sub>2</sub>. *Plant, Cell and Environment*, 8: 467-474.
- Morse LJ, Day TA, Faeth SH (2002) Effect of *Netyodium* endophyte infection on growth and leaf gas exchange of Arizona fescue under contrasting water availability regimes. *Environmental and Experimental Botany*, 48: 257-268.

- Muller P, Xiao-Ping L, Niyogi K (2001) Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology*, 125: 1558-1556.
- Murray DR (1995) Plant responses to carbon dioxide. *American Journal of Botany*, 82: 690-697.
- Musgrave ME, Strain BR (1988) Response of two wheat cultivars to CO<sub>2</sub> enrichment under subambient oxygen conditions. *Plant Physiology*, 87: 346-350.
- Natali SM, Sañudo-Wilhelmy A, Lerdau MT (2009) Effects of elevated carbon dioxide and nitrogen fertilization on nitrate reductase activity in sweetgum and loblolly pine trees in two temperate forests. *Plant Soil*, 314: 197-210.
- Nie GY, Hendrix DL, Weber AN, Kimball BA, Long SP (1995) Increased accumulation of carbohydrates and decreased photosynthetic gene transcript levels in wheat grown at an elevated CO<sub>2</sub> concentration in the field. *Plant Physiology*, 108: 975-983.
- Niklaus PA, Leadley PW, Schmid B, Körner C (2001) A long-term field study on biodiversity X elevated CO<sub>2</sub> interactions in grassland. *Ecological Monographs*, 71: 341–356.
- Nogués S, Alegre L. 2002. An increase in water deficit has no impact on the photosynthetic capacity of field-grown Mediterranean plants. *Functional and Plant Biology*, 29: 621–630.
- Norby RJ, Wullschleger SD, Gunderson CA, Johnson DW, Ceulemans R (1999) Tree responses to rising CO<sub>2</sub> in field experiments: implications for the future forest. *Plant, Cell and Environment*. 22: 683-714.
- Nowak RS, Ellsworth DS, Smith SD (2004) Tansley Review: Functional responses of plants to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> – Do photosynthetic and productivity data from FACE experiments support early predictions? *New Phytologist*, 162: 253-280.
- O'Neal D, Joy KW (1973) Glutamine synthetase of pea leaves. I. Purification, stabilization and pH optima. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 159: 113-122.
- Oaks A (1995) Evidence for deamination by glutamate dehydrogenase in higher plants. *Canadian Journal of Botany*, 73: 1116-1117.
- Ögren E (1990) Evaluation of chlorophyll fluorescence as a probe for drought stress in willow leaves. *Plant Physiology*, 93: 1280–1285.

- Oosterhuis DM, Wullschleger SD (1987) Osmotic adjustment in cotton leaves and roots in response to water stress. *Plant Physiology*, 84: 1154-1157.
- Ort DR, Baker NR (2002) A photoprotective role for O<sub>2</sub> as an alternative electron sink in photosynthesis? *Current Opinion of Plant Biology*, 5: 193-198.
- Owensby CE, Ham JM, Knapp AK, Bremer D, Auen LM (1997) Water vapour fluxes, their impact under elevated CO<sub>2</sub> in a C<sub>4</sub>-tallgrass prairie. *Global Change Biology*, 3: 189-195.
- Parmesan C, Yohe G (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, 421: 37-42.
- Parson R, Ogstone SA (1997) Photosyn Assistant Windows software for analysis of photosynthesis. Dundee Scientific. Scotland, UK.
- Patterson DT, Highsmith MT, Flint EP (1988) Effects of temperature and CO<sub>2</sub> concentration on the growth of cotton (*Gossipium birsutum*), spurred anoda (*Anoda cristata*) and velvetleaf (*Abutilon Theopbrasti*). *Weed Science*, 36: 751-757.
- Patterson TB, Guy RD, Dan QL (1997) Whole-plant nitrogen-and water-relations traits, and their associated trade-off, in adjacent muskeg and upland boreal spruce species. *Oecologia*, 110: 160-168.
- Peña-Rojas K, Aranda X, Fleck I (2004) Stomatal limitation to CO<sub>2</sub> assimilation and down-regulation of photosynthesis in *Quercus ilex* L. resprouts under slowly-imposed drought. *Tree Physiology*, 24: 813-822.
- Peñuelas J, Idso SB, Ribas A, Kimball BA (1997) Effects of long-term atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment on the mineral concentration of *Citrus aurantium* leaves. *New Phytologist*, 135: 439-444.
- Peñuelas J, Filella I (2001) Phenology: responses to a warming world. *Science* 294: 793-795.
- Peñuelas J, Filella I, Comas P (2002) Changed plant and animal life cycles from 1952 to 2000 in the Mediterranean region. *Global Change Biology*, 8: 531-544.
- Pérez de Juan J (1996) Interacción entre estrés hídrico y tolerancia al frío en maíz. Tesis Doctoral. Universidad de Navarra. España.
- Pérez-López U (2008) Respuestas fisiológicas de la cebada a la interacción de la salinidad y el elevado CO<sub>2</sub>. Prospección ante el cambio climático. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco/EHU.

- Pérez-López U, Robredo A, Lacuesta M, Mena-Petite A, Muñoz-Rueda A (2009) The impact of salt stress on the water status of barley plants is partially mitigated by elevated CO<sub>2</sub>. *Environmental and Experimental Botany*, 66: 463-470.
- Pérez-López U, Robredo A, Lacuesta M, Muñoz-Rueda A, Mena-Petite A (2010) Atmospheric CO<sub>2</sub> concentration influences the contributions of osmolyte accumulation and cell wall elasticity to salt tolerance in barley cultivars. *Journal of Plant Physiology*, 167: 15-22.
- Pett M (1986) Acclimation to high CO<sub>2</sub> in monoecious cucumbers. I. Vegetative and productive growth. *Plant Physiology*, 80: 59-62.
- Pettersson R, MacDonald JS, Stadenburg I (1993) Response of small birch plants (*Betula pendula* Roth.) to elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen supply. *Plant, Cell and Environment*, 16: 1115-1121.
- Picon C, Guehl JM, Aussenac G (1996) Growth dynamics, transpiration, water-use efficiency in *Quercus robur* plants submitted to elevated CO<sub>2</sub>, drought. *Annales des Sciences Forestières*, 53: 431-446.
- Pigeaire A, Sebillotte M, Blanchet R (1988) Water stress in indeterminate soybeans: No critical stage in fruit development. *Agronomie*, 8: 881-888.
- Ponce-Valadez M, Watkins CB (2008) Fermentation and malate metabolism in response to elevated CO<sub>2</sub> concentration in two strawberry cultivars. *Physiologia Plantarum* 134: 121-133.
- Polley HW, Johnson HB, Mayeux HS (1994) Increasing CO<sub>2</sub>: comparative responses of the C<sub>4</sub> grass *Schizachyrium* and grassland invader *Prosopis*. *Ecology*, 75: 976-988.
- Polley HW, Tischler CR, Johnson HB, Pennington RE (1999) Growth, water relations, and survival of drought exposed seedlings from six maternal families of honey mesquite (*Prosopis glandulosa*): response to CO<sub>2</sub> enrichment. *Tree Physiology*, 19: 359-366.
- Poorter H, Pot S, Lambers H (1988) The effect of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration on growth, photosynthesis and respiration of *Plantago major*. *Physiologia Plantarum*, 73: 553-559.
- Poorter H (1989) Interspecific variation in relative growth rate: on ecological causes and physiological consequences. En: Lambers H et al., (eds) "Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants; pp. 45-68". SPB Academic Publishing. The Hague, The Netherlands.

- Poorter H, Remkes C, Lambers H (1990) Carbon and nitrogen economy of 24 wild species differing in relative growth rate. *Plant Physiology*, 94: 621-627.
- Poorter H, Bergkotte M (1992) Chemical composition of 24 wild species differing in relative growth rate. *Plant, Cell and Environment*, 15: 221-229.
- Poorter H (1993) Interspecific variation in the growth response of plant to an elevated ambient CO<sub>2</sub> concentration. *Vegetatio*, 104/105: 77-97.
- Poorter H (1998) Do slow-growing species and nutrient-stressed plants respond relatively strongly to elevated CO<sub>2</sub>? *Global Change Biology*, 4: 693-697.
- Poorter H, Nagel O (2000) The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO<sub>2</sub>, nutrients and water: a quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27: 595-607.
- Poorter H, Navas ML (2003) Plant growth and competition at elevated CO<sub>2</sub>: on winners, losers and functional groups. *New Phytologist*, 157: 175-198.
- Porter MA, Grodzinski B (1984) Acclimation to high CO<sub>2</sub> in bean. Carbonic anhydrase and ribulose biphosphate carboxylase. *Plant Physiology*, 74: 413-416.
- Prior SA, Rogers HH (1995) Soybean growth response to water supply and atmospheric carbon dioxide enrichment. *Journal of Plant Nutrition*, 18: 617-636.
- Prior SA, Runion GB, Mitchell RJ, Rogers HH, Amthor JS (1997) Effects of atmospheric CO<sub>2</sub> on longleaf pine: productivity and allocation as influenced by nitrogen and water. *Tree Physiology*, 17: 397-405.
- Pritchard SG, Rogers HH, Prior SA, Peterson CM (1999) Elevated CO<sub>2</sub> and plant structure: a review. *Global Change Biology*, 5: 807-837.
- Purvis AC, Peters DB, Hageman RH (1974) Effect of carbon dioxide accumulation and nitrate reductase induction in corn seedlings. *Plant Physiology*, 53: 934-941.
- Reddy VR, Acock B, Acock MC (1989) Seasonal carbon and nitrogen accumulation in relation to net carbon dioxide exchange in a carbon dioxide-enriched soybean canopy. *Agronomy Journal*, 81: 78-83.
- Renou JL, Gerbaud A, Just D, André M (1990) Differing substomatal and chloroplastic concentrations in water-stressed wheat. *Planta*, 182: 415-419.
- Robredo A, Pérez-López U, Sainz de la Maza H, González-Moro B, Lacuesta M, Mena-Petite A, Muñoz-Rueda A (2007) Elevated CO<sub>2</sub> alleviates the impact of drought on barley improving water status by lowering stomatal conductance, delaying its effects on photosynthesis. *Environmental and Experimental Botany*, 59: 252-263.

- Robredo A, Pérez-López U, Lacuesta M, Mena-Petite A, Muñoz-Rueda A (2010) Influence of water stress on photosynthetic characteristics in barley plants under ambient and elevated CO<sub>2</sub> concentrations. *Biologia Plantarum*, 54: 285-292.
- Robredo A, Pérez-López U, Miranda-Apodaca J, Lacuesta M, Mena-Petite A, Muñoz-Rueda A (2011) Elevated CO<sub>2</sub> reduces the drought effect on nitrogen metabolism in barley plants during drought and subsequent recovery. *Environmental and Experimental Botany*, 71: 399–408.
- Rogers HH, Sionit N, Cure JD, Smith HM, Binham GE (1984) Influence of elevated CO<sub>2</sub> on water relations of soybeans. *Plant Physiology*, 74: 233-238.
- Rogers A, Fisher B, Bryant J, Frehner M, Blum H, Raines C, Long SP (1998) Acclimation of photosynthesis to elevated CO<sub>2</sub> under low-nitrogen nutrition is affected by capacity for assimilate utilization. Perennial ryegrass under free-air CO<sub>2</sub> enrichment. *Plant Physiology*, 118: 683-689.
- Rosenqvist E (2001) Light acclimation maintains the redox state of the PS II electron acceptor Q<sub>A</sub> within a narrow range over a broad range of light intensities. *Photosynthesis Research*, 70: 299-310.
- Rufty TW, Thomas RB, Cure JD, Cure WW (1994) Growth response of cotton to CO<sub>2</sub> enrichment in differing light environments. *Physiologia Plantarum*, 91: 503-509.
- Sabaté S, Gracia C, Sánchez A (2002) Likely effects of climate change on growth of *Quercus ilex*, *Pinus halepensis*, *Pinus pinaster*, *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica* forests in the Mediterranean region. *Forest Ecology and Management*, 162: 23-37.
- Samarakoon AB, Gifford RM (1995) Soil water content under plants at high CO<sub>2</sub> concentration and interactions with the direct CO<sub>2</sub> effects: a species comparison. *Journal of Biogeography*, 22: 193-202.
- Samarakoon AB, Müller WJ, Gifford RM (1995) Transpiration, leaf area under elevated CO<sub>2</sub>: effects of soil water status, genotype in wheat. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 33-44.
- Sampol B, Bota J, Riera D, Medrano H, Flexas J (2003) Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. *New Phytologist*, 160: 403–412.

- Sánchez-Díaz M, Pardo M, Antolín M, Peña J, Aguirreolea J (1990) Effect of water stress on photosynthetic activity in the *Medicago-Rhizobium-Glomus* symbiosis. *Plant Science*, 71: 215-221.
- Sánchez-Rodríguez J, Pérez P, Martínez-Carrasco R (1999) Photosynthesis, carbohydrate levels and chlorophyll fluorescence-estimated intercellular CO<sub>2</sub> in water-stressed *Casuarina equisetifolia* Forst. and Forst. *Plant, Cell and Environment*, 22: 867-873.
- Sánchez-Díaz M, García JL, Antolín MC, Araus JL (2002) Effects of soil drought and atmospheric humidity on yield, gas exchange, and stable carbon isotope composition of barley. *Photosynthetica*, 40: 415-421.
- Saxe H, Ellksworth DS, Heath J (1998) Transley Review: Tree and Forest functioning in an enriched CO<sub>2</sub> atmosphere. *New Phytologist*, 139: 395-436.
- Scholander PF, Hammel HT, Badstreet ED, Hemmingsen EA (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science*, 148: 339-346.
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research*, 10: 51-62.
- Schreiber U, Neubauer C (1987) The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination. II. Partial control by the photosystem II donor side and possible ways of interpretation. *Zeitschrift für Naturforschung C-A Journal of Biosciences*, 42: 1255-1264.
- Schreiber U, Rientis KG (1987) ATP induced photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *FEBS Letters*, 211: 99-104.
- Schultz HR (2003) Differences in hydraulic architecture account for near-isohydric and anisohydric behaviour of two field-grown *Vitis vinifera* L. cultivars during drought. *Plant, Cell and Environment*, 26: 1393-1405.
- Schulze ED, Robichaux RH, Grace J, Rundel PW, Ehleringer JR (1987) Plant water balance: In diverse habitats, where water often is scarce, plants display a variety of mechanisms for managing this essential resource. *Bioscience*, 37: 30-37.
- Schwanz P, Polle A (2001) Differential stress responses of antioxidative systems to drought in pedunculate oak (*Quercus robur*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) grown under high CO<sub>2</sub> concentrations. *Journal of Experimental Botany*, 52: 133-143.

- Sebastia MT, Casals P, Domínguez G, Costa J (2003) Agricultura i silvicultura. En: I. d. E. Catalans (ed.). Informe sobre el Canvi climatic a Catalunya. Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya, Barcelona.
- Seneweera S, Ghannoum O, Conroy JP (2001) Root and shoot factors contribute to the effect of drought on photosynthesis and growth of the C<sub>4</sub> grass *Panicum coloratum* at elevated CO<sub>2</sub> partial pressures. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28: 451-460.
- Shanner DL, Boyer JS (1974) Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. I. Regulation by nitrate flux. *Plant Physiology*, 58: 499-504.
- Sharkey TD, Badger MR (1982) Effects of water stress on photosynthetic electron transport, photophosphorylation, metabolite levels of *Xanthium strumarium* mesophyll cells. *Planta*, 156: 199-206.
- Sharkey TD (1985) Photosynthesis of intact leaves of C<sub>3</sub> plants: physics, physiology and rate limitations. *Botanical Review*, 51: 53-105.
- Sharma A, Sen Gupta UK (1990) Carbon dioxide enrichment effects of photosynthesis and related enzymes in *Vigna radiata* L. Wilczek. *Indian Journal of Plant Physiology*, 33: 340-346.
- Sibout R, Guerrier G (1998) Solute incompatibility with glutamine synthetase in water-stressed *Populus nigra*. *Environmental and Experimental Botany*, 40: 173-178.
- Sicher RC (1997) Irradiance spectral quality affect chlorosis of barley primary leaves during growth in elevated carbon dioxide. *International Journal of Plant Science*, 158: 602-607.
- Sicher RC, Bunce JA (1997) Relationship of photosynthetic acclimation to changes of Rubisco activity in field-grown winter wheat, barley during growth in elevated carbon dioxide. *Photosynthesis Research*, 52: 27-38.
- Sicher RC (1998) Yellowing, photosynthetic decline of barley primary leaves in response to CO<sub>2</sub> enrichment. *Physiologia Plantarum*, 103: 193-200.
- Sicher RC (1999) Photosystem-II activity is decreased by yellowing of barley primary leaves during growth in elevated carbon dioxide. *International Journal of Plant Science*, 160: 849-854.
- Sicher RC, Kremer DF (1999) Rubisco activity is altered in a starchless mutant of *Nicotiana sylvestris* grown in elevated carbon dioxide. *Environmental and Experimental Botany*, 36: 385-391.



- Sicher RC (2001) Responses of nitrogen metabolism in N-sufficient barley primary leaves to plant growth in elevated atmospheric carbon dioxide. *Photosynthesis Research*, 68: 193-101.
- Silveira JAG, Costa RCL, Viegas RA, Oliveira JTA, Figueiredo MVB (2003) N-compound accumulation and carbohydrate shortage on N<sub>2</sub> fixation in drought-stressed and rewatered cowpea plants. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1: 65-75.
- Sinclair TR, Pinter PJ, Kimball BA, Adamsen FJ, LaMorte RL, Wall GW, Hunsaker DJ, Adam N, Brooks TJ, García RL, Thompson T, Leavitt S, Matthias A (2000) Leaf nitrogen concentration of wheat subjected to elevated [CO<sub>2</sub>] and either water or N deficits. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 79: 53-60.
- Singsaas EL, Ort DR, De Lucia EH (2003) Elevated CO<sub>2</sub> effects on mesophyll conductance and its consequences for interpreting photosynthetic physiology. *Plant, Cell and Environment*, 27: 41–50.
- Sinha SK, Nicholas DJD (1981) Nitrate reductase. En: Paleg LG, Aspinall D (eds.) "The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants; pp.145-169". Academic Press, Sydney.
- Sionit N, Hellmers H, Strain BR (1980) Growth and yield of wheat under CO<sub>2</sub> enrichment and water stress. *Crop Science*, 20: 687-690.
- Skopelitis DS, Paranychianakis NV, Paschalidis KA, Pliakonis ED, Delis ID, Yakoumakis DI, Kouvarakis A, Papadakis AK, Stephanou EG, Roubelakis-Angelakis KA (2006) Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *The Plant Cell*, 18: 2767-2781.
- Smith AM, Neuhaus HE, Stitt M (1990) The impact of decreased activity of starch branching enzyme on photosynthetic starch synthesis in leaves of wrinkled pea seeds. *Planta*, 181: 310-315.
- Smith DS, Huxman TE, Zitzer SF, Charlet TN, Housman DC, Coleman JS, Fenstermaker LK, Seemann JR, Nowak RS (2000) Elevated CO<sub>2</sub> increases productivity and invasive species success in an arid ecosystem. *Nature*, 408: 79–82.
- Sobrado MA, Turner NC (1986) Photosynthesis, dry matter accumulation and distribution in the wild sunflower *Helianthus petiolaris* and the cultivate

- sunflower *Helianthus annuus* as influenced by water deficits. *Oecologia*, 69:181-187.
- Solomonson LP, Barber MJ (1990) Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41: 225-253.
- Somers DA, Kuo TM, Kleinhofs A, Warner RL, Oaks A (1983) Synthesis and degradation of barley nitrate reductase. *Plant Physiology*, 72: 949-952.
- Spollen WG, Sharp RE, Saab IN, Wu Y (1993) Regulation of cell expansion in roots and shoots at low water potentials. En: Smith JAC, Griffiths H (eds.) "Water deficits: plant responses from cell to community; pp. 37-52". Bios Scientific Publishers, Oxford.
- Srivastava HS, Singh RP (1987) Role and regulation of L-glutamate deshydrogenase activity in higher plants. *Phytochemistry*, 26: 597-610.
- Stewart GR, Mann AF, Fentem PA (1980) Enzymes of glutamate metabolism. En: Stumpf PK, Conn EE (eds.) "The biochemistry of Plants Amino acids and Derivates; pp. 271-327". Academic Press. New York.
- Stewart GR, Shatilov VR, Turnbull MH, Robinson SA, Goodall R (1995) Evidence that glutamate-dehydrogenase plays a role in the oxidative deamination of glutamate in seedlings of *Zea mays*. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 805-809.
- Stitt M (1991) Rising CO<sub>2</sub> levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment*, 14: 741-762.
- Stitt M, Krapp A (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant, Cell and Environment*, 22: 583-621.
- Taylor G, Ranasinghe S, Bosac C, Gardner SDL, Ferris R (1994) Elevated CO<sub>2</sub> and plant growth: cellular mechanisms and responses of whole plants. *Journal of Experimental Botany*, 45: 1761-1774.
- Tehunen JD, Pearcy RW, Lange OL (1987) Diurnal variations in leaf conductance and gas exchange in natural environments. En: Zeiger E, Farquhar GD, Cowan IR (eds.) "Stomatal function; pp. 323-352". Stanford University Press, Stanford, California. USA.
- Teulat B, This D, Khairallah M, Borries C, Ragot C, Sourdille P, Leroy P, Monneveux P, Charrier A (1998) Several QTLs involved in osmotic-adjustment trait

- variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). Theoretical and Applied Genetics, 96: 688–98.
- Tezara W, Lawlor DW (1995) Effects of water stress on the biochemistry, physiology of photosynthesis in sunflower. En: Mathis P (ed.) “Photosynthesis: from Light to Biosphere; vol. IV pp. 625-628”. Dordrecht: Kluwer.
- Tezara W, Mitchell V, Driscoll SP, Lawlor DW (1999) Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. Nature, 401: 914-917.
- Tezara W, Mitchell V, Driscoll SP, Lawlor DW (2002) Effects of water deficit and its interaction with CO<sub>2</sub> supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. Journal of Experimental Botany, 53: 1781-1791.
- Tezara W, Driscoll SP, Lawlor DW (2008) Partitioning of photosynthesis electron flow between CO<sub>2</sub> assimilation and O<sub>2</sub> reduction in sunflower plants under water deficit. Photosynthetica, 46: 127-134.
- Tingey DT, Johnson MG, Phillips DL, Johnson DW, Ball JT (1996) Effects of elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen on the synchrony of shoot and root growth in ponderosa pine. Tree Physiology, 16: 905-914.
- Tissue DT, Griffin KL, Thomas RB, Strain BR (1995) Effects of low and elevated CO<sub>2</sub> on C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> annuals. II. Photosynthesis, leaf biochemistry. Oecologia, 101: 21-28.
- Tissue DT, Thomas RB, Strain BR (1997) Atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment increases growth and photosynthesis of *Pinus Taeda*, a 4 year experiment in the field. Plant, Cell and Environment, 20: 1123-1134.
- Tissue DT, Griffin KL, Turnbull MH, Whitehead D (2001) Canopy position and needle age affect photosynthetic response in field grown *Pinus radiata* after five years exposure to elevated carbon dioxide partial pressure. Tree Physiology, 21: 915–923.
- Tognetti R, Longobucco A, Miglietta F, Raschi A (1998) Transpiration and stomatal behaviour of *Quercus ilex* plants during summer in a Mediterranean carbon dioxide spring. Plant, Cell and Environment, 21: 613-622.
- Tognetti R, Minnocci A, Peñuelas J, Raschi A, Jones MB (2000) Comparative field water relations of three Mediterranean shrub species co-occurring at a natural CO<sub>2</sub> vent. Journal of Experimental Botany, 51: 1135-1146.

- Tourneaux C, Peltier G (1995) Effect of water deficit on photosynthetic oxygen exchange measured using  $^{18}\text{O}_2$  and mass spectrometry in *Solanum tuberosum* L. Leaf discs. *Planta*, 195: 570-577.
- Townend J (1993) Effects of elevated carbon dioxide, drought on the growth, physiology of clonal sitka spruce [*Picea sitchensis* (Bong.) car]. *Tree Physiology*, 13: 389-399.
- Trifilò P, Raimondo F, Nardini A, Lo Gullo MA, Salleo S (2004) Drought resistance of *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle: root hydraulics and water relations. *Tree Physiology*, 24: 107–114.
- Tschaplinski TJ, Stewart DB, Norby RJ (1995) Interactions between drought and elevated  $\text{CO}_2$  on osmotic adjustment and solute concentrations of tree seedlings. *New Phytologist*, 131: 169-177.
- Tuba Z, Proctor MCF, Takács Z (1999) Desiccation-tolerant plants under elevated air  $\text{CO}_2$ : A review. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences*, 54c: 788-796.
- Tucker DE, Aller DJ, Ort DR (2004) Control of nitrate reductase by circadian and diurnal rhythms in tomato. *Planta*, 219: 277-285.
- Turner NC (1997) Further progress in crop water relations. *Advances in Agronomy*, 58: 293-338.
- Tyree MT, Alexander J, Machado JL (1992) Loss of hydraulic conductivity due to water stress in intact juveniles of *Quercus rubra* and *Populus deltoides*. *Tree Physiology*, 10: 411-415.
- Tyree MT, Alexander JD (1993) Plant water relations and the effects of elevated  $\text{CO}_2$ : a review and suggestions for future research. *Vegetatio*, 104/105: 47-62.
- Ulman P, Catsky J, Pospisilova J (2000) Photosynthetic traits in wheat grown under decreased, increased  $\text{CO}_2$  concentration, after transfer to natural  $\text{CO}_2$  concentration. *Biologia Plantarum*, 43: 227-237.
- Urban O, Pokorný R, Kalina J, Marek MV (2003) Control mechanisms of photosynthetic capacity under elevated  $\text{CO}_2$  concentrations: evidence from three experiments with Norway spruce trees. *Photosynthetica*, 41: 69-75.
- Usami T, Lee J, Oikawa T (2001) Interactive effects of increased temperature and  $\text{CO}_2$  on the growth of *Quercus myrsinaefolia* saplings. *Plant, Cell and Environment*. 24:1007–1019.

- Usuda H (2004) Evaluation of the effect of photosynthesis on biomass production with simultaneous analysis of growth and continuous monitoring of CO<sub>2</sub> exchange in the whole plants of Radish, cv Kosena under ambient and elevated CO<sub>2</sub>. *Plant Production Science*, 7:386-396.
- Valladares F, Vilagrosa A, Peñuelas J, Ogaya R, Camarero JJ, Corcuera L, Sisó S, Gil-Pelegrin E (2004) Estrés hídrico: Ecofisiología y escalas de la sequía. En: Valladares F (ed.) "Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante". Organismo Autónomo de Parques Nacionales. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid.
- Valladares F, Peñuelas J, De Luis-Calabuig E (2005) Impactos sobre los ecosistemas terrestres. Evaluación preliminar de los impactos en España del cambio climático (ECCE); pp. 65-112. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid.
- Venekamp JH (1989) Regulation of cytosolic acidity in plants under conditions of drought. *Physiologia Plantarum*, 76: 112-117.
- Villagra PE, Cavagnaro JB (1996) Water stress effects on the seedling growth of *Prosopis argentina* and *Prosopis alata*. *Journal of Arid Environments*, 64: 390-400.
- Vitousek PM, Mooney HA, Lubchenco J, Melillo JM (1997) Human domination of Earth's ecosystems. *Science*, 277: 494-499.
- Vivin P, Guehl JM (1997) Changes in carbon uptake and allocation patterns in *Quercus robur* seedlings in response to elevated CO<sub>2</sub> and water stress: an evaluation with <sup>13</sup>C labelling. *Annals of Forest Science*, 54: 597-610.
- Volaire F (2003) Seedling survival under drought differs between an annual (*Hordeum vulgare*) and a perennial (*Dactylis glomerata*). *New Phytologist*, 160: 501-510.
- Volenc JJ, Ourry A, Joern BC (1996) A role for nitrogen reserves in forage regrowth and stress tolerance. *Physiologia Plantarum*, 97: 185-193.
- Volk M, Niklaus PA, Körner C (2000) Soil moisture effects determine CO<sub>2</sub> responses of grassland species. *Oecologia*, 125: 380-388.
- von Caemmerer S, Farquhar GD (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange rates of leaves. *Planta*, 153: 376-387.
- von Caemmerer S, Farquhar GD (1984) Effects of partial defoliation, changes of irradiance during growth, short-term water stress, growth at enhanced p(CO<sub>2</sub>) on the photosynthetic capacity of leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, 160: 320-329.

- Vu JCV, Baker JT, Pennanen AH, Allen LHJ, Bowes G, Boote KJ (1998) Elevated CO<sub>2</sub>, water deficit effects on photosynthesis, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, carbohydrate metabolism in rice. *Physiologia Plantarum*, 103: 327-339.
- Vu JCV, Allen LHJ, Gesch RW (2006) Up-regulation of photosynthesis and sucrose metabolism enzymes in young expanding leaves of sugarcane under elevated growth CO<sub>2</sub>. *Plant Science*, 171: 123-131.
- Wallsgrave RM, Lea PJ, Miflin BJ (1979) Distribution of the enzyme of nitrogen assimilation within the pea leaf cell. *Plant Physiology*, 63: 232-236.
- Wallsgrave RM, Keys AJ, Bird IF, Cornelius MJ, Lea PJ, Miflin BJ (1980) The location of glutamine synthetase in leaf cells and its role in the reassimilation of ammonia released in photorespiration. *Journal of Experimental Botany*, 31: 1005-1017.
- Wallsgrave RM, Lea PJ, Miflin BJ (1983) Intracellular localization of aspartate kinase and the enzymes of threonine and methionine biosynthesis in green leaves. *Plant Physiology*, 71: 780-786.
- Wallsgrave RM, Turner JC, Hall, NP, Kendall AC, Brights, WJ (1987) Barley mutants lacking chloroplasts glutamine synthetase- Biochemical and Genetic analysis. *Plant Physiology*, 83: 155-158.
- Walther GR, Post E, Convey P, Menzel A, Parmesan C, Beebee TJC, Fromentin JM, Hoegh-Guldbergi O, Bairlein F (2002) Ecological responses to recent climate change. *Nature*, 426: 389-395.
- Wang X, Curtis PS, Pregitzer KS, Zak DR (2000) Genotype variation in physiological, growth responses of *Populus tremuloides* to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration. *Tree Physiology*, 20: 1019-1028.
- Ward JK, Strain BR (1999) Elevated CO<sub>2</sub> studies: past, present, future. *Tree Physiology*, 19: 211-220.
- Ward JK, Tissue DT, Thomas RB, Strain BR (1999) Comparative responses of model C3 and C4 plants to drought an elevated CO<sub>2</sub>. *Global Change Biology*, 5: 857-867.
- Warren CR (2004) The photosynthetic limitation posed by internal conductance to CO<sub>2</sub> movement is increased by nutrient supply. *Journal of Experimental Botany*, 55: 2313-2321.

- Webb AAR, Taylor JE, McAinsh MR, Hetherington AM (1996) Calcium ions as intracellular second messengers in plants. *Advances in Botanical Research*, 22: 45-96.
- Webb AAR, Larman MG, Montgomery LT, Taylor JE, Hetherington AM (2001) The role of calcium in ABA-induced gene expression, stomatal movements. *Plant Journal*, 26: 351-362.
- Werner C, Correia O, Beyschlag W (1999) Two different strategies of Mediterranean macchia plants to avoid photoinhibitory damage by excessive radiation levels during summer drought. *Acta Oecologia*, 20: 15-23.
- Westgate ME, Boyer JS (1985) Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. *Planta*, 164: 540-549.
- Wild A, Sauer H, Rühle W (1987) The effect of phosphinotricin (glufosinate) on photosynthesis. I. Inhibition of photosynthesis and accumulation of ammonia. *Zeitschrift für Naturforschung C-A Journal of Biosciences*, 42c:263-267.
- Williams MH, Rosenqvist E, Buchhave M (1999) Response of potted miniature roses (*Rosaxhybrida*) to reduced water availability during production. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 74: 301–308.
- Wilson KB, Baldocchi DD, Hanson PJ (2000) Quantifying stomatal and non-stomatal limitations to carbon assimilation resulting from leaf aging and drought in mature deciduous tree species. *Tree Physiology*, 20: 787–797.
- Wingler A, Quick WP, Bungard RA, Bailey KJ, Lea PJ, Leegood RC (1999) The role of photorespiration during drought-stress: an analysis utilizing barley mutants with reduced activities of photorespiratory enzymes. *Plant, Cell and Environment*, 22: 361-373.
- Wong SC, Cowan IR, Farquhar GD (1978) Leaf conductance to assimilation in *Eucalyptus pauciflora* Sieb. Ex Spreng. *Plant Physiology*, 62: 670-674.
- Wong SC (1979) Elevated atmospheric partial pressure of CO<sub>2</sub> and plant growth. I. Interaction of nitrogen nutrition and photosynthetic capacity in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Oecologia*, 44: 68-74.
- Wong SC (1990) Elevated atmospheric partial pressure of CO<sub>2</sub> and plant growth. II. Non-structural carbohydrate content and its effect on growth parameters. *Photosynthesis Research*, 23: 171-180.
- Woodward I, Smith TM, Emanuel WR (1995) A global land primary productivity and phytogeography model. *Global Biochemical Cycles*, 9: 471–490.

- Woodward FI (2002) Potential impacts of global elevated CO<sub>2</sub> concentrations on plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 207–211.
- Wray JL, Filner P (1970) Structural and functional relationships of enzyme activities induced by nitrate in barley. *Biochemical Journal*, 119: 715-725.
- Wu DX, Wang GX (2000) Interaction of CO<sub>2</sub> enrichment and drought on growth, water use, and yield of broad bean (*Vicia faba*). *Environmental and Experimental Botany*, 43: 131-139.
- Wu DX, Wang GX, Bai YF, Liao JX, Ren HX (2002) Response of growth and water use efficiency of spring wheat to whole season CO<sub>2</sub> enrichment and drought. *Acta Botanica Sinica*, 44: 1477-1483.
- Wu DX, Wang GX, Bai YF, Liao JX (2004) Effects of elevated CO<sub>2</sub> concentration on growth, water use, yield and grain quality of wheat under two soil water levels. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 104: 493-507.
- Wulf RD, Strain BR (1982) Effects of CO<sub>2</sub> enrichment on growth and photosynthesis in *Desmodium paniculatum*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique*, 6: 1084-1091.
- Wullschlegel SD, Norby RJ (2001) Sap velocity and canopy transpiration in a sweetgum stand exposed to free-air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE). *New Phytologist*, 150: 489-498.
- Wullschlegel SD, Tschaplinski TJ, Norby RJ (2002) Plant water relations at elevated CO<sub>2</sub> – implications for water-limited environment. *Plant, Cell and Environment*, 25: 319-331.
- [www.cervezadeargentina.com.ar/articulos/maltas.htm](http://www.cervezadeargentina.com.ar/articulos/maltas.htm)
- [www.infoagro.com/herbaceos/forrajes/cebada.asp](http://www.infoagro.com/herbaceos/forrajes/cebada.asp), [www.gro.itesm.mx/agronomia2/extensivos/CCebadaindicedecultivo.html](http://www.gro.itesm.mx/agronomia2/extensivos/CCebadaindicedecultivo.html)
- Wyn Jones RG, Gorham J (1983) Osmoregulation. En: Lange OL (ed.) “Encyclopaedia of Plant Physiology, vol 12C. Responses to the chemical and biological environment. *Physiological Plant Ecology* 3, pp. 35-58”. Springer-Verlag, Berlin.
- Xu LK, Baldocchi DD (2003) Seasonal trends in photosynthetic parameters and stomatal conductance of blue oak (*Quercus douglasii*) under prolonged summer drought and high temperature. *Tree Physiology*, 23: 865-877.



- Xu ZZ, Yu ZW (2006) Nitrogen metabolism in flag leaf and grain of wheat in response to irrigation regimes. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 169: 118-126.
- Xu ZZ, Zhou GS (2006a) Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*. *Planta*, 224: 1080-1090.
- Xu ZZ, Zhou GS (2006b) Nitrogen metabolism and photosynthesis in *Leymus chinensis* in response to long-term soil drought. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25: 252-266.
- Yegappan TM, Paton DM, Gates CT (1982) Water stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 2. Effects on leaf cells and leaf area. *Annals of Botany*, 49: 63-68.
- Yin CY, Duan BL, Wang X, Li CY (2004) Morphological and physiological responses of two contrasting *Poplar* species to drought stress and exogenous abscisic acid application. *Plant Science*, 167: 1091-1097.
- Yin CY, Wang X, Duan BL, Luo JX, Li CY (2005) Early growth, dry matter allocation and water use efficiency of two sympatric *Populus* species as affected by water stress. *Environmental and Experimental Botany*, 53: 315-322.
- Yu J, Woo KC (1988) Glutamine transport and the role of glutamine translocator in chloroplasts. *Plant Physiology*, 88: 1048-1054.
- Zeiger E, Talbott LD, Frechilla S, Srivastava A, Zhu JX (2002) The guard cell chloroplast: A perspective for the twenty-first century. *New Phytologist*, 153: 415-424.
- Zerihun A, McKenzie BA, Morton JD (1998) Photosynthate costs associated with the utilization of different nitrogen-forms: influence on the carbon balance of plants and shoot-root biomass partitioning. *New Phytologist*, 138: 1-11.
- Zhang S, Dang QL (2005) Effects of soil temperature and elevated CO<sub>2</sub> concentration on gas exchange, *in vivo* carboxylation and chlorophyll fluorescence in jack pine and white birch seedlings. *Tree Physiology*, 25: 609-617.
- Zhao X-Z, Wang G-X, Shen Z-X, Zhang H, Qiu MQ (2006) Impact of elevated CO<sub>2</sub> concentration under three soil water levels on growth of *Cinnamomum camphora*. *Journal of Zhejiang University Science B*, 7: 283-290.
- Zhou YH, Yu JQ, Huang LF, Nogues S (2004) The relationship between CO<sub>2</sub> assimilation, photosynthetic electron transport and water–water cycle in chill-exposed cucumber leaves under low light and subsequent recovery. *Plant, Cell and Environment*, 27: 1503–1514.

- Ziska LH, Teramura AH (1992) Intraespecific variation in the response of rice (*Oryza sativa*) to increased CO<sub>2</sub>-photosynthetic, biomass, and reproductive characteristics. *Physiologia Plantarum*, 84: 269-276.
- Ziska LH, Bunce JA (1994) Increasing growth temperature reduces the stimulatory effect of elevated CO<sub>2</sub> on photosynthesis or biomass in two perennial species. *Physiologia Plantarum*, 91: 183-190.
- Ziska LH, Sicher RC, Kremer DF (1995) Reversibility of photosynthetic acclimation of Swiss chard and sugar beet grown at elevated concentrations of CO<sub>2</sub>. *Physiologia Plantarum*, 95: 355-364.

Los cambios en la concentración de  $\text{CO}_2$  y en la disponibilidad hídrica afectan a varios procesos fisiológicos en las plantas. En general, una concentración de  $\text{CO}_2$  elevada aumenta la biomasa, el crecimiento de las raíces y el área total de las hojas, y altera las tasas de fotosíntesis neta, la conductancia estomática y la eficiencia en el uso del agua. No obstante, la magnitud de tales respuestas depende de la disponibilidad de otros recursos como la del nitrógeno del suelo, la temperatura o la luz. Sin embargo, el factor más limitante para la productividad de los ecosistemas terrestres es el agua. De ese modo, la interacción entre la elevada  $[\text{CO}_2]$  y el agua del suelo es de capital relevancia para la comprensión de la respuesta de las plantas frente al Cambio Climático. En esta tesis se ha analizado el efecto combinado del enriquecimiento de  $\text{CO}_2$  y el estrés hídrico en cebada (*Hordeum vulgare* cv. Iranis) durante la imposición progresiva de sequía, cuantificando las respuestas fisiológicas tanto desde el punto de vista de las relaciones hídricas como del intercambio gaseoso, la fotoquímica de la fotosíntesis, la asimilación de nitrógeno y el crecimiento, determinando, además, la capacidad de las plantas para recuperarse de la sequía a la concentración de  $\text{CO}_2$  actual o a la que se prevé para el futuro.

Nuestros resultados muestran que plantas de cebada creciendo en riego y elevada  $[\text{CO}_2]$  presentan un mejor estado hídrico, mayor asimilación de C, menor pérdida de agua por transpiración, mayor asimilación de N y mayor contenido de proteínas totales y de pigmentos que las plantas en riego y  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Por otro lado, la sequía afecta negativamente a todos los parámetros hídricos analizados, a la fotosíntesis, a la asimilación de N, así como a la concentración de proteínas y pigmentos fotosintéticos. Al analizar el efecto combinado de la sequía y la elevada  $[\text{CO}_2]$  se ha observado menor efecto de la sequía que en plantas de  $[\text{CO}_2]$  ambiental. El contenido hídrico foliar y del suelo descienden menos, las tasas de fotosíntesis se mantienen durante más tiempo, la asimilación de N se ve menos afectada y el crecimiento es más elevado que en plantas de  $[\text{CO}_2]$  ambiental. Por otro lado, al restablecer el riego en plantas de sequía se observa que en la mayoría de parámetros

analizados el efecto de la sequía revierte bajo ambas  $[\text{CO}_2]$ . Todo ello pone de manifiesto que bajo condiciones futuras de  $[\text{CO}_2]$  la fisiología de la cebada se vería menos afectada por la sequía que en condiciones de  $\text{CO}_2$  ambiental, retrasando durante un periodo de tiempo más prolongado las repercusiones negativas de la falta de precipitaciones que acompañan al Cambio Climático.

