



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

**Respuesta fisiológica de
especies pratenses
en monocultivo y
en competencia mixta
frente al elevado CO₂ y la sequía
derivados del cambio climático**

Tesis doctoral

Jon Miranda González de Apodaca

Leioa, Diciembre 2015



Respuesta fisiológica de
especies pratenses
en monocultivo y en competencia mixta
frente al elevado CO₂ y la sequía
derivados del cambio climático

**Physiological response of
grassland species
in monoculture and in mixture
to climate change related
elevated CO₂ and drought**

Memoria presentada por Jon Miranda González de Apodaca para optar al Grado de Doctor en Biología

Jon Miranda González de Apodaca

Leioa, Diciembre 2015

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.

Asimismo, me gustaría dar las gracias:

Al grupo de estrés abiótico del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca-CSIC por permitirme realizar una estancia en su laboratorio. Especialmente al Dr. Rafael Martínez-Carrasco Tabuenca, a la Dra. Pilar Pérez Pérez y a la Dra. Rosa María Morcuende Morcuende por su amabilidad y disponibilidad en todo momento.

Al grupo dirigido por el Dr. Karel Doležal del Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, University of Palackeho por permitirme realizar una estancia en su laboratorio. Asimismo, también me gustaría agradecer especialmente al Dr. Lukáš Spíchal y a la Dra. Nuria de Diego.

El autor de esta tesis doctoral ha disfrutado de una Ayuda Predoctoral de Formación de Investigadores del Departamento de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco (BFI09.344).

Este trabajo de investigación ha sido financiado parcialmente por MICINN-BFU2010-16349/BFI cofinanciado con fondos FEDER, Unesco 09/18, K-EGOKITZEN IE10-277, UFI11/24, PPV 12/08 y GRUPO Gobierno Vasco IT326-10 y IT577-13.

Listado de abreviaturas

| | |
|----------------|---|
| Ψ_o^{100} | Potencial osmótico a plena turgencia <i>Osmotic potential at full turgor</i> |
| Ψ_{omd} | Potencial osmótico foliar al mediodía <i>Midday leaf osmotic potential</i> |
| Ψ_{opd} | Potencial osmótico foliar al amanecer <i>Predawn leaf osmotic potential</i> |
| Ψ_{pmd} | Potencial de pared foliar al mediodía <i>Midday leaf turgor potential</i> |
| Ψ_{ppd} | Potencial de pared foliar al amanecer <i>Predawn leaf turgor potential</i> |
| Ψ_{wmd} | Potencial hídrico foliar al mediodía <i>Midday leaf water potential</i> |
| Ψ_{wpd} | Potencial hídrico foliar al amanecer <i>Predawn leaf water potential</i> |
| A | Tasa de asimilación de CO ₂ CO ₂ assimilation rate |
| Ac | <i>Agrostis capillaris</i> |
| ADF | Fibra ácido detergente <i>Acid detergent fiber</i> |
| AO | Ascorbato oxidasa <i>Ascorbate oxidase</i> |
| APX | Ascorbato peroxidasa <i>Ascorbate peroxidase</i> |
| Asa | Ascorbato <i>Ascorbate</i> |
| BHT | Hidroxitolueno butilado <i>Butylated hydroxytoluene</i> |
| BSA | Seroalbúmina bovina <i>Bovine serum albumin</i> |

| | |
|-----------------------|--|
| CAT | Catalasa <i>Catalase</i> |
| Ci | Concentración intercelular de CO ₂ <i>Intercellular CO₂ concentration</i> |
| CK | Creatina quinasa <i>Creatine kinase</i> |
| DH | Deshidratación <i>Dehydration</i> |
| Dha | Dehidroascorbato <i>Dehydroascorbate</i> |
| DHAR | Dehidroascorbato reductasa <i>Dehydroascorbate reductase</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido <i>Dimethylsulfoxide</i> |
| DTNB | Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) <i>5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)</i> |
| DTT | Ditiotreitol <i>Dithiotreitol</i> |
| DW | Peso seco <i>Dry weight</i> |
| E | Tasa de transpiración instantánea <i>Instantaneous transpiration rate</i> |
| EDTA | Etilendiaminotetraacetato <i>Ethylenediaminetetraacetate</i> |
| EGTA | Etilenglicoltetraacetato <i>Ethyleneglycoltetraacetate</i> |
| ETR | Tasa de transporte de electrones <i>Electron transport rate</i> |
| F₀' | Fluorescencia basal en hojas adaptadas a la luz <i>Basal light-adapted fluorescence</i> |
| F₀ | Fluorescencia basal en hojas adaptadas a la oscuridad <i>Basal dark-adapted fluorescence</i> |
| F_m' | Fluorescencia máxima en hojas adaptadas a la luz <i>Maximum light-adapted fluorescence</i> |
| F_m | Fluorescencia máxima en hojas adaptadas a la oscuridad <i>Maximum dark-adapted fluorescence</i> |

| | |
|----------------|--|
| Fr | <i>Festuca rubra</i> |
| Ft | Fluorescencia en estado estacionario <i>Fluorescence in steady state</i> |
| Fv'/Fm' | Eficiencia fotoquímica en hojas adaptadas a la luz <i>Photochemical efficiency of PSII in light-adapted leaves</i> |
| Fv/Fm | Eficiencia fotoquímica en hojas adaptadas a la oscuridad <i>Photochemical efficiency of PSII in dark-adapted leaves</i> |
| FW | Peso fresco <i>Fresh weight</i> |
| G3PDH | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> |
| G6PDH | Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa <i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase</i> |
| GR | Glutación reductasa <i>Glutathione reductase</i> |
| gs | Conductancia estomática <i>Stomatal conductance</i> |
| Gsh | Glutación reducido <i>Reduced glutathione</i> |
| Gssg | Glutación oxidado <i>Oxidized glutathione</i> |
| GVA | Análisis gráfico de vectores <i>Graphical vector analysis</i> |
| HC | Conductancia hidráulica <i>Hydraulic conductance</i> |
| Hepes | Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico <i>4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> |
| ITE | Eficiencia instantánea en el uso del agua <i>Instantaneous water use efficiency</i> |
| IVDMD | Digestibilidad enzimática de la materia seca <i>in vitro</i> <i>In vitro dry matter digestibility</i> |
| LAR | Relación de área foliar <i>Leaf area ratio</i> |
| LHCI | Complejo antena I <i>Light harvesting complex I</i> |
| LHCII | Complejo antena II <i>Light harvesting complex II</i> |

| | |
|--------------|--|
| LWR | Relación de masa foliar <i>Leaf weight ratio</i> |
| Mdha | Monodehidroascorbato <i>Monodehydroascorbate</i> |
| MDHAR | Monodehidroascorbato reductasa <i>Monodehydroascorbate reductase</i> |
| MQ | Milli-Q (agua ultrapura) Milli-Q (ultrapure water) |
| NAR | Tasa de asimilación neta <i>Net assimilation rate</i> |
| NDF | Fibra neutro detergente <i>Neutral detergent fiber</i> |
| NPQ | <i>Quenching</i> no fotoquímico <i>Non-photochemical quenching</i> |
| OA | Ajuste osmótico <i>Osmotic adjustment</i> |
| PGK | Fosfoglicerato quinasa <i>Phosphoglycerate kinase</i> |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo Phenylmethylsulfonyl fluoride |
| PSI | Fotosistema I <i>Photosystem I</i> |
| PSII | Fotosistema II <i>Photosystem II</i> |
| PVPP | Polivinilpolipirrolidona <i>Polyvinylpolypyrrolidone</i> |
| qP | <i>Quenching</i> fotoquímico <i>Photochemical quenching</i> |
| RCI | Intensidad de la competencia relativa <i>Relative competition intensity</i> |
| RGR | Tasa de crecimiento relativo <i>Relative growth rate</i> |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno <i>Reactive oxygen species</i> |
| RSWC | Contenido hídrico relativo del suelo <i>Relative soil water content</i> |

| | |
|----------------------|--|
| RuBP | Ribulosa 1,5-bisfosfato <i>Ribulose 1,5-bisphosphate</i> |
| RWC | Contenido hídrico relativo foliar <i>Relative leaf water content</i> |
| SE | Error estándar <i>Standard error</i> |
| SLA | Área foliar específica <i>Specific leaf area</i> |
| SOD | Superóxido dismutasa <i>Superoxide dismutase</i> |
| TBA | Ácido tiobarbitúrico <i>Thiobarbituric acid</i> |
| TCA | Ácido tricloroacético <i>Trichloroacetic acid</i> |
| Tp | <i>Trifolium pratense</i> |
| Tr | <i>Trifolium repens</i> |
| Tris | 2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol <i>2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol</i> |
| TW | Peso turgente <i>Turgid weight</i> |
| XOD | Xantina oxidasa <i>Xanthine oxidase</i> |
| XUR | Tasa de toma para cada nutriente mineral (X) <i>Mineral (X) uptake rate</i> |
| ε | Módulo de elasticidad <i>Volumetric elasticity modulus</i> |
| θ_v | Contenido volumétrico de agua en el suelo <i>Soil volumetric water content</i> |
| ΦPSII | Rendimiento cuántico del PSII <i>Actual quantum yield of PSII</i> |

Resumen

El uso de combustibles fósiles junto con la deforestación y otras causas antropogénicas están provocando un incremento de los gases de efecto invernadero, teniendo como consecuencia final el cambio climático. Además de un aumento de la concentración atmosférica de CO₂, se prevé que se incrementen los periodos de sequía.

Debido a la importancia como alimento para el ganado de los ecosistemas de praderas, y para dilucidar los efectos de estos factores ambientales en dicho ecosistema, se ha estudiado la respuesta fisiológica de varias especies pratenses (leguminosas y gramíneas), analizando las relaciones hídricas, el metabolismo fotosintético, el metabolismo antioxidante, el crecimiento y la calidad forrajera de las mismas. Además, se ha investigado si el tipo de competencia (intra- e interespecífica) al que son sometidas las plantas altera dicha respuesta.

El elevado CO₂ aumentó el crecimiento de ambos grupos funcionales gracias a unas mayores tasas de asimilación de CO₂ debido a la mayor disponibilidad de éste en los cloroplastos. Sin embargo, redujo la calidad forrajera al aumentar la relación C/N de *Trifolium pratense*.

La sequía redujo el contenido de agua de las plantas, a la vez que provocó un descenso en la turgencia y un cierre estomático. Esto desencadenó que las plantas dispusieran de una menor concentración de CO₂ en los cloroplastos lo que redujo la tasa de asimilación de CO₂ y, en último término, el crecimiento.

El elevado CO₂ mitigó parcialmente el efecto negativo de la sequía en el crecimiento de las especies estudiadas, al presentar las plantas un mayor potencial de pared que a CO₂ ambiental, gracias a un mayor ajuste osmótico en el caso de *Trifolium pratense* y, en el caso de *Agrostis capillaris*, por una menor reducción del potencial hídrico. Además, gracias a la mayor disponibilidad de CO₂ en los cloroplastos, la tasa de asimilación fue mayor que cuando la sequía se imponía a CO₂ ambiental. Ambos factores permitieron a las plantas un mayor crecimiento.

El crecimiento en cultivo mixto redujo el crecimiento de las gramíneas debido, por un lado, a una menor capacidad de interceptar luz por la morfología y mayor tamaño de las hojas de las leguminosas y, por otro lado, a una menor capacidad de captar agua y nutrientes minerales por un sistema radical menos desarrollado y unos valores de conductancia hidráulica inferiores.

Estos resultados confirman parte de las hipótesis planteadas inicialmente de que el elevado CO₂ y la sequía tendrían efectos antagónicos y que se observarían diferencias entre los grupos funcionales, y que tales efectos variarían además en función del tipo de competencia. En último término, la respuesta fisiológica de las especies pratenses frente al elevado CO₂ y la sequía, derivados del cambio climático, será dependiente del tipo de competencia al que estén sometidas.

Laburpena

Erregai fosilen erabilera, deforestazioa eta beste arrazoi antropogenikoak berotegi-efektuko gasen gehitzea eragiten ari dira, klima-aldaketa azken emaitza delarik. Atmosferako CO₂-aren kontzentrazioa handitzeaz gain, lehorte aldiak areagotzea aurreikusten da.

Aziendarako belardiak oso garrantzitsuak dira abere-bazka gisa. Ekosistema honetan ingurumen-faktore horien ondorioak argitzeko, hainbat belarditako espezieen (lekadunen eta lastodunen) erantzun fisiologikoa aztertu da, ur-erlazioak, metabolismo fotosintetiko zein antioxidatzailea, hazkuntza eta espezie horien bazka-kalitatea ikertuz. Gainera, analizatu da larreetako espezieen arteko lehiaketa motak (espeziearteko lehiaketak edo espeziebarneko lehiaketak) eragin hori aldatzen duen.

CO₂-aren kontzentrazio altuak bi talde funtzionalen hazkuntza handitu zuen asimilazio-tasa altuagoari esker kloroplastoetako CO₂-aren eskuragarritasuna handiagoa izan zelako. Hala ere, CO₂-aren kontzentrazio altuak bazkaren kalitatea murriztu zuen *Trifolium pratense* espeziean C/N erlazioa handitzean.

Lehorteak landareen ur-edukia gutxitu zuen, turgentziaren murrizpena eta estomen itxierarekin batera. Horrela, landareen kloroplastoetako CO₂-kontzentrazioa txikiagoa izanda, CO₂-aren asimilazio-tasa murriztu zen eta, azken ondorio moduan, landareen hazkundera ere.

CO₂-aren kontzentrazio altuak espezieen hazkundera neurtutako lehortearen eragin negatiboak partzialki arindu zituen, landareek pareta-potentzial handiagoa izan zutelako egungo CO₂-aren kontzentrazio baldintzetan baino. Egoera hori lortu zen *Trifolium pratense*-ko doitze osmotiko altuagoak eta *Agrostis capillaris*-aren ur-potentzialaren jaitsiera murriztuagoak baimenduta. Gainera, kloroplastoetako CO₂-aren eskuragarritasun handiagoari esker, asimilazio-tasa altuagoa izan zen lehortean egungo CO₂-aren kontzentraziokoarekin alderatuta. Bi faktoreok baimendu zuten landareen hazkuntza altuagoa.

Labore mistoko hazteak lastodunen hazkundera murriztu zuen bi arrazoiengatik. Alde batetik, lekadunen hostoen morfologia eta tamaina handiagatik argia xurgatzeko bere gaitasun murriztuagatik eta, beste aldetik, sustrai-sistema gutxi garatua eta ur-konduktantzia baxuagoa izanda, ura eta mantenugai mineralak eskuratzeko ahalmen txikiagoagatik.

Emaitza hauek hasierako zenbait hipotesi baieztatzen dute. Horrela, CO₂-aren kontzentrazio altuak eta lehorteak aurkako eraginak erakutsi dituzte, talde funtzionalen artean erantzun desberdinak azaldu dira, eta erantzun horiek guztiak kompetentzia-motaren arabera izan dira. Azkenik, belardiko espezieen erantzun fisiologikoa aldaketa klimatikotik deribatutako CO₂-aren kontzentrazio altuaren eta lehortearen aurrean jasango duten espezieen arteko kompetentziaren arabera izango da.

Summary

The use of fossil fuels coupled with deforestation and other anthropogenic causes have provoked an increase in greenhouse gases, with the final result of climate change. In addition to an augmentation in the atmospheric concentration of CO₂, it is expected an increase in the periods of drought.

Because of the importance of the grassland ecosystems as food for cattle, and to elucidate the effects of these environmental factors in the ecosystem, the physiological response of several grassland species (legumes and grasses) has been studied, analyzing the water relations, the photosynthetic metabolism, antioxidant metabolism, growth, and forage quality. Furthermore, it has been investigated whether the type of competition (intra- and interspecific) to which plants are subjected alters that response.

The elevated CO₂ increased growth of both functional groups due to higher CO₂ assimilation rates as a result of the increased availability of CO₂ in chloroplasts. However, it reduced forage quality by increasing the C/N ratio of *Trifolium pratense*.

Drought reduced the water content of the plants, while leading to a decline in the turgor and stomatal closure. This provoked a lower concentration of CO₂ in chloroplasts, which reduced CO₂ assimilation rate and, ultimately, growth.

The elevated CO₂ partially mitigated the negative effect of drought on growth of the studied species, due to a higher turgor potential than at ambient CO₂, by a greater osmotic adjustment in the case of *Trifolium pratense* and, in the case of *Agrostis capillaris*, by a smaller reduction in water potential. In addition, due to the greater availability of CO₂ in chloroplasts, the assimilation rate was higher than when the drought was imposed on ambient CO₂. Both factors led to a higher growth.

The growth in mixture reduced the growth of grasses, on one hand, due to a lower light intercepting capability by the morphology and larger leaves of legumes and, on the other hand, due to a lower water and mineral uptake capacity, because the grasses presented a less developed root system and a lower hydraulic conductance.

These results confirm part of the hypothesis: that high CO₂ and drought would have antagonistic effects and that differences between the functional groups would be observed, and that these effects also would vary depending on the type of competition. Ultimately, the physiological response of grassland species to elevated CO₂ and drought related to climate change will be dependent on the type of competition to which they are subjected.

Índice

| | |
|--|----|
| 1. General introduction | 1 |
| 1.1. Effects of drought on plant physiology | 2 |
| 1.2. Effects of elevated CO ₂ on plant physiology | 3 |
| 1.3. Interactive effects of elevated CO ₂ and drought on plant physiology | 4 |
| 1.4. Effects of the type of competition on plant physiology | 5 |
| 1.5. Characteristics of the studied species | 6 |
| 1.6. Objectives | 7 |
| 1.7. Benefits: diffusion and advantages | 8 |
| 2. Materials and methods | 11 |
| 2.1 Plant material and experimental design | 11 |
| 2.1.1 Four species experiment | 11 |
| 2.1.1.1. Plant material | 11 |
| 2.1.1.2. Growth conditions | 11 |
| 2.1.1.3. Imposed treatments | 13 |
| 2.1.1.3.1. Competition treatment | 13 |
| 2.1.1.3.2. Drought treatment | 13 |
| 2.1.1.3.3. CO ₂ treatment | 14 |
| 2.1.2. Two species experiment | 14 |
| 2.1.2.1. Plant material | 14 |
| 2.1.2.2. Growth conditions | 14 |
| 2.1.2.3. Imposed treatments | 15 |
| 2.1.2.3.1. Competition treatment | 15 |
| 2.1.2.3.2. Drought treatment | 16 |
| 2.1.2.3.3. CO ₂ treatment | 16 |
| 2.1.2.4. Plant material harvest | 17 |
| 2.2. Water relations | 17 |
| 2.2.1. Relative soil water content (RSWC) | 17 |
| 2.2.2. Leaf relative water content (RWC) | 18 |
| 2.2.3. Water potential (Ψ_w) | 18 |
| 2.2.4. Osmotic potential (Ψ_o) | 19 |
| 2.2.5. Turgor potential (Ψ_p) | 20 |
| 2.2.6. Dehydration (DH) | 20 |

| | |
|---|----|
| 2.2.7. Osmotic adjustment (OA) and osmotic contribution of osmolytes..... | 21 |
| 2.2.8. Proline determination..... | 21 |
| 2.2.8.1. Proline extraction..... | 21 |
| 2.2.8.2. Proline quantification..... | 22 |
| 2.2.9. Soluble sugars determination..... | 22 |
| 2.2.9.1. Soluble sugars extraction..... | 22 |
| 2.2.9.2. Sugar quantification..... | 23 |
| 2.2.9.2.1. Glucose and fructose determination..... | 24 |
| 2.2.9.2.2. Sucrose determination..... | 24 |
| 2.2.10. Volumetric elasticity modulus (ϵ)..... | 25 |
| 2.2.11. Whole-plant transpiration..... | 26 |
| 2.2.12. Hydraulic conductance (HC)..... | 26 |
| 2.3. Photosynthetic metabolism..... | 26 |
| 2.3.1. Gas exchange parameters..... | 26 |
| 2.3.2. Chlorophyll a fluorescence determination..... | 28 |
| 2.3.3. Photosynthetic pigments determination..... | 30 |
| 2.3.4. Starch determination..... | 31 |
| 2.3.4.1. Starch extraction..... | 31 |
| 2.3.4.2. Starch quantification..... | 31 |
| 2.3.5. Rubisco activity determination (EC 4.1.1.39)..... | 32 |
| 2.3.5.1. Rubisco extraction..... | 32 |
| 2.3.5.2. Rubisco quantification..... | 33 |
| 2.4. Antioxidant metabolism..... | 34 |
| 2.4.1. Superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity determination..... | 34 |
| 2.4.1.1. SOD extraction..... | 34 |
| 2.4.1.2. SOD activity quantification..... | 35 |
| 2.4.2. Catalase (CAT; EC 1.11.1.6) activity determination..... | 36 |
| 2.4.2.1. CAT extraction..... | 36 |
| 2.4.2.2. CAT activity quantification..... | 36 |
| 2.4.3. Ascorbate peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) activity determination..... | 37 |
| 2.4.3.1. APX extraction..... | 37 |
| 2.4.3.2. APX activity quantification..... | 37 |
| 2.4.4. Monodehydroascorbate reductase (MDHAR; EC 1.6.5.4) activity determination..... | 38 |
| 2.4.4.1. MDHAR extraction..... | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.4.2. MDHAR activity quantification..... | 38 |
| 2.4.5. Dehydroascorbate reductase (DHAR; EC 1.8.5.1) activity determination | 39 |
| 2.4.5.1. DHAR extraction | 39 |
| 2.4.5.2. DHAR activity quantification | 39 |
| 2.4.6. Glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2) activity determination | 40 |
| 2.4.6.1. GR extraction | 40 |
| 2.4.6.2. GR activity quantification..... | 40 |
| 2.4.7. Reduced ascorbate (Asa) and oxidized ascorbate (Dha) determination..... | 41 |
| 2.4.7.1. Ascorbate extraction | 41 |
| 2.4.7.2. Asa and Dha quantification..... | 41 |
| 2.4.8. Reduced glutathione (Gsh) and oxidized glutathione (Gssg) determination .. | 42 |
| 2.4.8.1. Glutathione extraction..... | 42 |
| 2.4.8.2. Gsh and Gssg quantification | 42 |
| 2.4.9. Lipid peroxidation (Mda) determination..... | 43 |
| 2.4.9.1. Mda Extraction..... | 43 |
| 2.4.9.2. Mda quantification | 43 |
| 2.5. Mineral content | 44 |
| 2.5.1. Extraction and determination of macro- and micronutrients | 44 |
| 2.5.2. Nutrient uptake rate..... | 44 |
| 2.6. Growth parameters..... | 45 |
| 2.6.1. Absolute growth parameters determination | 45 |
| 2.6.2. Relative growth parameters determination | 45 |
| 2.6.2.1. Relative growth rate (RGR) | 46 |
| 2.6.2.2. Net assimilation rate (NAR) | 46 |
| 2.6.2.3. Leaf area ratio (LAR)..... | 47 |
| 2.6.3. Competition index..... | 47 |
| 2.7. Forage quality | 48 |
| 2.7.1. Fiber concentration and in vitro dry matter digestibility | 48 |
| 2.7.2. Total proteins determination | 49 |
| 2.7.2.1. Total proteins extraction | 49 |
| 2.7.2.2. Total proteins quantification | 49 |
| 2.8. Statistical analysis..... | 49 |
| 3. The type of competition modulates the ecophysiological response of grassland species to elevated CO₂ and drought | 51 |
| 3.1. Introduction..... | 51 |
| 3.2. Results..... | 54 |

| | |
|---|-----|
| 3.2.1. Water relations | 54 |
| 3.2.2. Gas exchange parameters..... | 56 |
| 3.2.3. Chlorophyll a fluorescence | 59 |
| 3.2.4. Aboveground biomass | 62 |
| 3.3. Discussion | 67 |
| 3.3.1 Effects of elevated CO ₂ under non-stress conditions..... | 67 |
| 3.3.2 Drought effects at ambient CO ₂ | 68 |
| 3.3.3 Drought effects at elevated CO ₂ | 71 |
| 3.3.4 Effects on productivity and competitiveness | 73 |
| 4. Water relations | 77 |
| 4.1. Introduction..... | 77 |
| 4.2. Results..... | 82 |
| 4.2.1. Soil water status | 82 |
| 4.2.2. Leaf water status in progressive drought | 83 |
| 4.2.3. Leaf water status in homogeneous drought..... | 85 |
| 4.2.4. Osmotic adjustment, dehydration and volumetric elasticity modulus in progressive drought..... | 88 |
| 4.2.5. Osmotic adjustment, dehydration and volumetric elasticity modulus in homogeneous drought | 93 |
| 4.2.6. Transpiration and hydraulic conductance in progressive drought | 98 |
| 4.2.7. Transpiration and hydraulic conductance in homogeneous drought..... | 100 |
| 4.3. Discussion | 104 |
| 4.3.1. Effects of drought under ambient CO ₂ | 104 |
| 4.3.2. Effects of drought under elevated CO ₂ | 108 |
| 4.4. Conclusions..... | 112 |
| 5. Metabolismo fotosintético | 115 |
| 5.1. Introducción | 115 |
| 5.2. Resultados | 119 |
| 5.2.1. Intercambio gaseoso en sequía progresiva..... | 119 |
| 5.2.2. Intercambio gaseoso en sequía homogénea | 122 |
| 5.2.3. Niveles de pigmentos en sequía progresiva | 126 |
| 5.2.4. Niveles de pigmentos en sequía homogénea..... | 127 |
| 5.2.5. Parámetros de fluorescencia en sequía progresiva..... | 129 |
| 5.2.6. Parámetros de fluorescencia en sequía homogénea | 131 |
| 5.2.7. Niveles de azúcares en sequía progresiva | 133 |

| | |
|---|------------|
| 5.2.8. Niveles de azúcares en sequía homogénea..... | 135 |
| 5.2.9. Actividad Rubisco en sequía progresiva..... | 137 |
| 5.2.10. Actividad Rubisco en sequía homogénea | 138 |
| 5.3. Discusión..... | 142 |
| 5.3.1. Diferencia entre especies | 142 |
| 5.3.2. Efecto de la competencia en condiciones ambientales | 143 |
| 5.3.3. Efecto del CO ₂ en condiciones de buen aporte hídrico | 143 |
| 5.3.4. Efecto de la sequía bajo CO ₂ ambiental | 146 |
| 5.3.5. Efecto de la sequía bajo CO ₂ elevado..... | 149 |
| 5.4. Conclusions..... | 154 |
| 6. Metabolismo antioxidante | 157 |
| 6.1. Introducción | 157 |
| 6.2. Resultados | 163 |
| 6.2.1. Actividades enzimáticas en sequía progresiva..... | 163 |
| 6.2.1.1. Superóxido dismutasa | 163 |
| 6.2.1.2. Catalasa | 164 |
| 6.2.1.3. Ascorbato peroxidasa | 165 |
| 6.2.1.4. Monodehidroascorbato reductasa..... | 165 |
| 6.2.1.5. Dehidroascorbato reductasa | 166 |
| 6.2.1.6. Glutación reductasa | 166 |
| 6.2.2. Actividades enzimáticas en sequía homogénea | 166 |
| 6.2.2.1. Superóxido dismutasa | 166 |
| 6.2.2.2. Catalasa..... | 167 |
| 6.2.2.3. Ascorbato peroxidasa..... | 168 |
| 6.2.2.4. Monodehidroascorbato reductasa..... | 168 |
| 6.2.2.5. Dehidroascorbato reductasa | 168 |
| 6.2.2.6. Glutación reductasa | 169 |
| 6.2.3. Niveles de metabolitos antioxidantes en sequía progresiva..... | 169 |
| 6.2.4. Niveles de metabolitos antioxidantes en sequía homogénea | 172 |
| 6.2.5. Peroxidación de lípidos en sequía progresiva | 175 |
| 6.2.6. Peroxidación de lípidos en sequía homogénea..... | 175 |
| 6.3. Discusión..... | 178 |
| 6.3.1. Efecto de la competencia en condiciones ambientales | 178 |
| 6.3.2. Efecto del CO ₂ en condiciones de buen aporte hídrico | 179 |
| 6.3.3. Efecto de la sequía bajo CO ₂ ambiental | 180 |

| | |
|--|-----|
| 6.3.4. Efecto de la sequía bajo CO ₂ elevado..... | 185 |
| 6.4. Conclusions..... | 189 |
| 7. Crecimiento y calidad..... | 191 |
| 7.1. Introducción..... | 191 |
| 7.2. Resultados..... | 196 |
| 7.2.1 Crecimiento absoluto en sequía progresiva..... | 196 |
| 7.2.2 Crecimiento absoluto en sequía homogénea..... | 201 |
| 7.2.3. Crecimiento relativo en sequía progresiva..... | 206 |
| 7.2.4. Crecimiento relativo en sequía homogénea..... | 209 |
| 7.2.5. Índice de competencia en sequía progresiva..... | 212 |
| 7.2.6. Índice de competencia en sequía homogénea..... | 212 |
| 7.2.7. Tasas de toma de nutrientes en sequía progresiva..... | 213 |
| 7.2.8. Tasas de toma de nutrientes en sequía homogénea..... | 214 |
| 7.2.9. Calidad forrajera en sequía progresiva..... | 215 |
| 7.2.10. Calidad forrajera en sequía homogénea..... | 216 |
| 7.3. Discusión..... | 222 |
| 7.3.1. Efecto de la competencia en condiciones ambientales..... | 222 |
| 7.3.2. Efecto del CO ₂ en condiciones de buen aporte hídrico..... | 225 |
| 7.3.3. Efecto de la sequía bajo CO ₂ ambiental..... | 228 |
| 7.3.4. Efecto de la sequía bajo CO ₂ elevado..... | 232 |
| 7.4. Conclusions..... | 237 |
| 8. General discussion..... | 239 |
| 9. Referencias bibliográficas..... | 253 |

1. General introduction

The increase in human population and the increased demand for energy, water and food, have resulted in the increase in greenhouse gases such as carbon dioxide (CO₂), methane (CH₄), nitrous oxide (N₂O), water vapor (H₂O), sulfur hexafluoride (SF₆), perfluorocarbons (PFC) and hydrofluorocarbons (HFC), which are causing the so-called Climate Change (IPCC, 2014).

The atmospheric CO₂ concentration has increased since the beginning of the industrial revolution, from a concentration of 280 μmol mol⁻¹ to the current concentration of 400 μmol mol⁻¹ (Stocker et al., 2011), mainly due to anthropogenic causes, such as consumption of fossil fuels (coal, oil and natural gas) and changes in land use such as agriculture and rapid deforestation. Recently, the IPCC (2013) has stated that the atmospheric concentration of CO₂ increases at an average rate of 2.0 ± 0.1 μmol mol⁻¹ year⁻¹, the largest average increase over a period of 10 years since direct CO₂ concentration measurements began in 1958. On this basis, in its predictions, the IPCC (2014) has established several scenarios regarding the future climate conditions; the average estimate of the concentration of CO₂ in the atmosphere at the end of the century is around 700 mol mol⁻¹, *i.e.*, twice as registered at the beginning of the same century.

Besides increasing the concentration of CO₂, climate change is expected to provoke a change in the amount of rainfall, increasing in some areas and significantly decreasing in others. In addition, rainfall patterns are expected to change, increasing extreme events of drought and flooding due to the change in the distribution of rainfall (IPCC, 2014), and these extreme events are more harmful to ecosystems that changes in the annual mean (Smith et al., 2005).

These global climatic changes can have major consequences for the terrestrial vegetation, such as short-term physiological responses in crop plants and long-term

changes in the structure and function of ecosystems (Mooney et al., 1991; Curtis et al., 1995), affecting, ultimately, the productivity of plant communities (Naudts et al., 2011; 2013; 2014).

1.1. Effects of drought on plant physiology

As mentioned above, it is expected that climate change will result in an increase in dry periods. Water availability is the most important factor in the development of plants (Boyer, 1982; Chaves et al., 2003). Plants respond to water deficit through two mechanisms: on one hand, reducing their water potential in order to try to keep the water uptake and, on the other hand, with stomatal closure to prevent the loss of water (Villar-Salvador et al., 2004; Stanton & Mickelbart, 2014). However, this stomatal closure provokes a lower availability of CO₂ in the chloroplasts with subsequent decrease in the rate of CO₂ assimilation (Cornic & Massacci, 1996; Cornic, 2000). When drought becomes more severe, effects on biochemical reactions and the use of light energy can occur (Tezara et al., 1999; Flexas et al., 2002; Lawlor & Cornic, 2002; Peña-Rojas et al., 2004).

Furthermore, by reducing the rate of CO₂ assimilation when the stomata are closed, the speed at which the plant consumes ATP and NADPH generated in the light phase of photosynthesis decreased by the lower activity of the enzymes in the Calvin cycle, causing a reduction in the electron linear transport rate (Flexas et al., 1999). If the energy input in the electron transport chain of the thylakoid does not decrease, through a lower concentration of pigments and, thus, capturing less light; or through dissipating the energy as heat; an excess energy would be generated in the chlorophylls of photosystems (Munné-Bosch & Alegre, 2000; Ort, 2001). To prevent or minimize damage to these structures that could be caused by the excess energy, the electrons produced in the photolysis of water are used in oxygenation reactions of photorespiration, or are channeled to other sinks such as the reaction of Mehler (Lawlor & Cornic, 2002; Robredo et al, 2007). However, both processes are at the origin of the

formation of reactive oxygen species (ROS) that can be harmful to the plant if they do not have detoxification systems (Pérez-López et al., 2010b).

Ultimately, all the aforementioned physiological processes are involved in the development of the plant and if they are affected by drought, crop productivity and ecosystems in general would be affected in the same way, showing declines depending on the intensity and duration of drought (Erice et al., 2011). Moreover, differences among species are also observed, as each species has different mechanisms for adaptation to drought (AbdElgawad et al., 2015).

1.2. Effects of elevated CO₂ on plant physiology

The increase in CO₂ concentration allows the plant to increase water use efficiency (Casella et al., 1996), since the high CO₂ causes stomatal closure hence reducing water loss (Lee et al., 2011), while increasing the rate of CO₂ assimilation due to the greater availability of CO₂ in chloroplasts (Wang et al., 2003; Pérez-López et al., 2012). This stimulation of CO₂ assimilation is higher in C₃ plants than in C₄ plants, because the present concentration of CO₂ does not saturate the Rubisco enzyme (Lawlor & Keys, 1993; Drake et al., 1997). However, this increase in CO₂ assimilation may be temporary, as in the long-term this effect may be lost, at least partly, as a result of acclimation of photosynthesis (Gunderson & Wullschleger, 1994; Del Pozo et al., 2007).

The increase in CO₂ assimilation increases the consumption of NADPH and ATP by the enzymes of the Calvin cycle, which reduces the risk of oxidative damage, because there is a better balance between production and consumption of NADPH and ATP (Marabottini et al., 2001). In addition, the higher rate of CO₂ assimilation associated with elevated CO₂ stimulates plant growth. Numerous studies have shown that plants have a wide range of responses to increasing concentrations of CO₂, both in wild plants and cultivated plants (Poorter & Navas, 2003 and references within). Such

responses depend not only on the concentration of CO₂, but also on other biotic and abiotic factors. In addition, the response of plants to increased CO₂ not only affect the productivity of ecosystems in the future, but also the magnitude of carbon sequestration by plants and therefore the increase rate of CO₂ in the atmosphere (Wang, 2007).

1.3. Interactive effects of elevated CO₂ and drought on plant physiology

When plants grow in combined conditions of elevated CO₂ and drought, it has been observed that these plants have a better water status than in the same situation of drought but at ambient CO₂ (Bunce & Ziska, 1998; Grossman-Clarque et al., 2001; Morgan et al., 2001; Robredo et al., 2007; 2010). Plants under elevated CO₂ lose water more slowly when subjected to drought, which is related to lower stomatal conductance and consequently lower transpiration rate (Bunce & Ziska, 1998; Robredo et al., 2007; 2010). It has also been suggested that elevated CO₂ could increase drought tolerance by permitting greater osmotic adjustment by the increased availability of carbohydrates that act as osmolytes or compatible solutes (Wall et al., 2006; Chen et al., 2015.). This fact permits the plants to maintain a high turgor pressure and prolong growth. In addition, by using less water, plants grown at elevated CO₂ provoke a slower soil drying (Grossman-Clarque et al., 2001; Robredo et al., 2007), thus, it can contribute to lower soil salinization, which is another problem associated with climate change.

Despite presenting lower stomatal conductance than the plants grown at ambient CO₂, the higher external CO₂ concentration and the minor metabolic limitations registered at elevated CO₂ permit a higher rate of CO₂ assimilation (Lawlor & Cornic, 2002; Robredo et al., 2007; 2010). This fact enables a more effective recycling of the products of the light phase of photosynthesis (ATP and NADPH), reducing the risk of formation of reactive oxygen species (Farfan-Vignolo & Asard, 2012).

In general, the better status of the plants in drought at elevated CO₂ compared to at ambient CO₂ would permit the plant to mitigate the negative effect of drought on productivity (Volk et al., 2000; Morgan et al., 2004; Soussana et al., 2007; Pérez-López et al., 2013b).

1.4. Effects of the type of competition on plant physiology

In natural ecosystems, plants coexist with other plants of the same and different species. This coexistence involves competition between them for the available resources such as water, mineral elements or light (Van der Werf et al., 1993; Warwick et al., 1998). In the current environmental conditions, each species grows depending on the available amount of resources. If the environmental conditions are altered, current physiological responses of species may be altered in the future, causing different growth rates and changing the pattern of competition. This fact could cause a lower net importance of certain species that are currently abundant or even the disappearance of them, and *vice versa* (Ehleringer et al., 2002; Evans et al., 2011; Crase et al., 2015).

It has been shown that the type of competition (intra- and interspecific) regulates ecophysiological response to various abiotic stresses, increasing the effect of such stresses in some species and/or functional groups and decreasing in other species and/or functional groups (Owensby et al., 1993; Thomas & Bazzaz, 1993; Wayne & Bazzaz, 1995; Körner, 1995; Lüscher et al., 1996; Bernston et al., 1998; Warwick et al., 1998; Dunnett & Grime, 1999; Goverde et al., 2002; Poorter & Navas, 2003; Suriyagoda et al., 2011; Verlinden et al., 2013).

Several studies have analyzed the response to elevated CO₂ and drought in various species when grown alone or in monoculture (Polley et al., 2002; Wullschlegel et al., 2002; Wall et al., 2006; 2011; Robredo et al., 2007; 2010). However, few studies have examined the interactive effects of elevated CO₂ and drought when plants are

grown in monoculture and in mixture (Dijkstra et al., 2010), and always aiming at the effect on growth.

1.5. Characteristics of the studied species

Grasslands are one of the largest ecosystems, covering about 25% of land cover (FAO, 2007), being about 40% of the potential agricultural area in Western Europe (Peeters et al., 2004). Since 1991, the area for both agriculture and grazing has remained constant (O'Mara, 2012). However, the OECD/FAO (2011) forecasts a 15-30% increase in meat consumption by the end of this decade, so the productivity of grasslands should increase to meet growing demand.

In addition to the productivity of pasture, forage quality obtained also affects livestock productivity. As noted above, the increased concentration of CO₂ would increase grassland productivity. However, as it has been repeatedly observed in numerous studies, elevated CO₂ would also increase the C/N ratio, decreasing the leaf nitrogen concentration by 10-20% and increasing the sugars by 20-30% (Owensby et al., 1996; Wand et al., 1999; Campbell & Stafford Smith, 2000; Ehleringer et al., 2002).

Furthermore, due to its wide spread, it is argued that the grassland ecosystem is of great importance as a potential mitigating factor of climate change through underground carbon sequestration (Scurlock & Hall, 1998). FAO (2010) established that the total carbon sequestration by grasslands is 50% higher than by the woods.

For this study, four of the dominant grasslands species in Atlantic Europe region were used: *Agrostis capillaris*, *Festuca rubra*, *Trifolium pratense*, and *Trifolium repens*.

Agrostis capillaris L., common bent grass, is a monocot of the Poaceae family. It is a rhizomatous perennial plant that reaches between 10 and 60 cm. It is native to Eurasia.

Festuca rubra L., red fescue, is a monocot of the Poaceae family. It is a rhizomatous perennial plant that reaches between 20 and 80 cm. It is native to Europe.

Trifolium pratense L., red clover, is a dicot of the Fabaceae family. It is a perennial short cycle plant that reaches between 20 and 110 cm and presents alternate trifoliolate leaves. It is native to Europe, western Asia and northwest Africa.

Trifolium repens L., white clover, is a dicot of the Fabaceae family. It is a perennial plant with creeping stems and trifoliolate green leaves all year with white spots. It is native to Europe, western Asia and North Africa.

1.6. Objectives

The overall objective of this study is to analyze the effect of two factors associated with climate change such as elevated CO₂ and drought, separately or in combination, on the ecophysiology of grassland species. At the same time, to determine whether there are differences among species and/or functional groups and to determine if the response to environmental variation is modulated by the type of competition in which plants grow. To achieve these general objectives, these were broken down into several specific objectives listed below.

- To analyze the individual and combined effect of drought and elevated CO₂ on water relations. It was also assessed how water status varies depending on the type of competition, intra or interspecific.

General introduction

- To study the photosynthetic metabolism response to drought and its interaction with elevated CO₂ in monoculture and in mixture.
- To characterize the effects of CO₂ enrichment and water deficit, together or separately, on the antioxidant metabolism involved in preventing damage caused by the formation of reactive oxygen species.
- To assess the impact of drought and/or elevated CO₂ on plant growth and productivity, as well as the consequences that climate change may have on the forage quality.
- To evaluate the competitiveness of the different species and the possible influence of elevated CO₂ and drought.

The hypothesis is that elevated CO₂ and drought would have antagonistic effects on the physiological processes of the species analyzed. In addition, differences in terms of the functional group would be detected, legumes being the species most affected by drought and grasses by elevated CO₂. Additionally, the type of competition would change the physiology of the species and it would affect the grasses more for their slower growth rate in the early stages of growth.

1.7. Benefits: diffusion and advantages

The analysis of the response of the physiological parameters studied in these grassland species to different stresses would permit to know the capacity of these species to face future climate conditions.

From a practical point of view, this knowledge would permit to elucidate the response that each species will have in the future climatic conditions and, as a whole, the ideal location in the future of pastures formed by these species depending on various factors such as distribution or abundance of rainfall in different regions.

The relationship between carbon and nitrogen content would help forecast possible changes concerning the quality of pastures as a livestock feed, when the C/N ratio and the fiber content of the grass are of great importance to nutrition of those animals. In this way, it would also permit to know if an increase in the area destined to pasture is necessary to meet the growing demand for livestock feed, continuously expanding.

Similarly, this study would permit to know whether or not there will be changes in the spatial distribution and/or the total biomass of each grassland species, to determine if other proportions or even other species would be needed to meet and satisfy future needs both quantitative and qualitative for livestock feed, and thus contribute to human food security in the future under climate change.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and experimental design

2.1.1. Four species experiment

2.1.1.1. Plant material

In this experiment, four common grassland species were used, two grasses [*Agrostis capillaris* L. (Ac) and *Festuca rubra* L. (Fr)] and two legumes [*Trifolium pratense* L. (Tp) and *Trifolium repens* L. (Tr)].

2.1.1.2. Growth conditions

Seedlings were grown in a mixture of peat/vermiculite (1/1 v/v) in 3 L pots (17.1 cm in diameter and 16.4 cm in height). Thirty-six seeds were sown in each pot and were watered three times per week for two weeks with deionized water. Then, the twelve more uniform plants were selected (Fig. 2.1), reaching a final density of 520 plant m⁻². Plants were watered with Hoagland's solution (Arnon & Hoagland, 1940; Table 2.1) twice per week and were also watered with deionized water between each application of Hoagland's solution until the beginning of the drought experiment (28 days old).

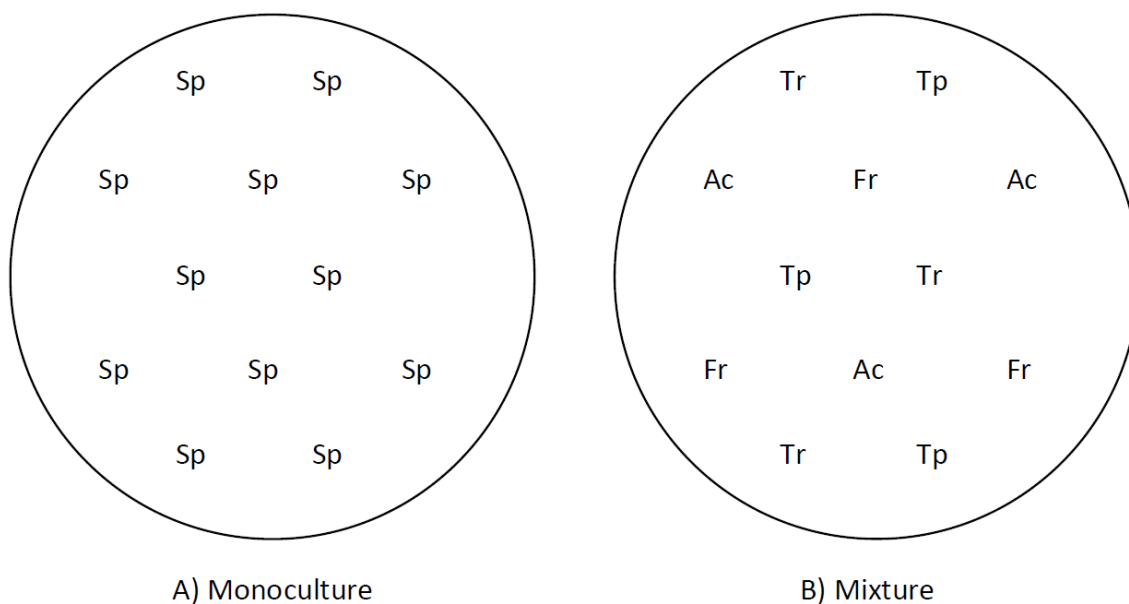


Fig. 2.1. Experimental layout. A) Monoculture of twelve plants of each of the following species: *Agrostis capillaris*, *Festuca rubra*, *Trifolium pratense* or *Trifolium repens*. B) Mixture of three *Agrostis capillaris* (Ac), three *Festuca rubra* (Fr), three *Trifolium pratense* (Tp) and three *Trifolium repens* (Tr).

Table 2.1. Chemical composition of the Hoagland' solution.

| <u>Macronutrients</u> | |
|---|----------------------|
| <u>Component</u> | <u>Concentration</u> |
| KNO₃ | 6 mM |
| Ca(NO₃)₂ · 4H₂O | 4 mM |
| NH₄H₂PO₄ | 1 mM |
| MgSO₄ · 7H₂O | 2 mM |
| <u>Micronutrients</u> | |
| <u>Component</u> | <u>Concentration</u> |
| MnCl₂ · 4H₂O | 9 µM |
| H₃BO₃ | 46 µM |
| ZnSO₄ · 7H₂O | 0,8 µM |
| CuSO₄ · 5H₂O | 0,3 µM |
| Na₂MoO₄ | 0,1 µM |
| Sequestrene (Fe) | 0,01 g/L |

Plants were grown in a Conviron E15 controlled environment growth chamber (Conviron, Manitoba, Canada) with a daily 14 h light regimen, an average day/night

temperature of 24/20 °C, and a relative day/night humidity of 70/80%. During the light period, the photosynthetic photon flux density in the chamber was 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Light was provided by a combination of incandescent bulbs and warm-white fluorescent lamps (Sylvania F48T12SHO/VHO, Sylvania, USA). To minimize the effects of intrachamber environmental gradients, plants were randomly repositioned within the chamber each week (Hymus et al., 2001).

2.1.1.3. Imposed treatments

2.1.1.3.1. Competition treatment

The plants were grown in two conditions of competition: monoculture (intraspecific competition) and mixture (intra- and interspecific competition). In monoculture, all the plants in each pot were from the same species (Fig. 2.1A), whereas in mixture, 3 plants per species were equally distributed (Fig. 2.1B).

2.1.1.3.2. Drought treatment

The drought treatment started at the 28th day after sowing and was imposed for 10 days. The beginning of the drought treatment marked the day 0 of the experiment, on that day, all pots were taken to field capacity. Then, the drought treatment consisted of limiting the watering to 20% of the daily evapotranspiration of the plants, while the well-watered plants were watered with the 100% of their daily evapotranspiration. During the drought period, the watering was alternated daily between Hoagland's solution and deionized water.

2.1.1.3.3. CO₂ treatment

The CO₂ treatments were: 370 μmol mol⁻¹ (ambient CO₂) and 740 μmol mol⁻¹ (elevated CO₂). The growth chamber atmosphere was maintained at ambient or elevated CO₂, from sowing throughout growth to the end of the experiment. The CO₂ concentration was monitored by the software of the Conviron E15 chamber.

2.1.2. Two species experiment

2.1.2.1. Plant material

For the two species experiment, two grassland species from the four species experiment were used: *Agrostis capillaris* L. (Ac; grass) and *Trifolium pratense* L. (Tp; legume).

2.1.2.2. Growth conditions

Seedlings were grown in a mixture of peat/vermiculite (1/1 v/v) in 6 L pots (21 cm in upper diameter, 16.5 cm in lower diameter, and 20 cm in height). Thirty-six seeds were sown in each pot and were watered every other day with deionized water for 4 days till the plants germinated. From here, and for 4 weeks, seedlings were watered two days a week with 250 mL of Hoagland's solution (Arnon y Hoagland, 1940; Table 2.1) and were also watered with deionized water between each application of Hoagland's solution to reach field capacity. In that moment, the twelve more uniform plants were selected, reaching a final density of 315 plant m⁻².

Plants were grown in a Conviron PGR15 controlled environment growth chamber (Conviron, Manitoba, Canada) with a daily 14 h light regimen, an average day/night

temperature of 24/20 °C, and a relative day/night humidity of 70/80%. During the light period, the photosynthetic photon flux density in the chamber was 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Light was provided by a combination of incandescent bulbs (Osram 70W Halogen Eco, Munich, Germany) and warm-white fluorescent lamps (Philips Master TL-D 70W 848, Amsterdam, The Netherlands). To minimize the effects of intrachamber environmental gradients, plants were randomly repositioned within the chamber each week (Hymus et al., 2001).

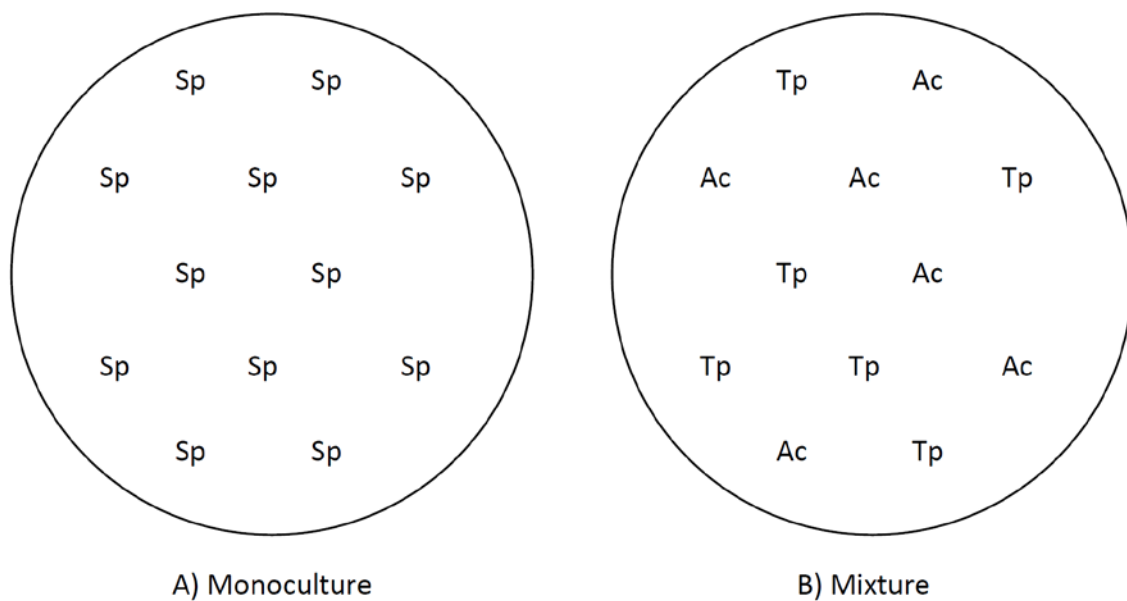


Fig. 2.2. Experimental layout. A) Monoculture of twelve plants of each of the following species: *Agrostis capillaris* and *Trifolium pratense*. B) Mixture of six *Agrostis capillaris* (Ac) and six *Trifolium pratense* (Tp).

2.1.2.3. Imposed treatments

2.1.2.3.1. Competition treatment

The plants were grown in two conditions of competition: monoculture (intraspecific competition) and mixture (intra- and interspecific competition). In monoculture, all the plants in each pot were from the same species (Fig. 2.1A), whereas in mixture, 6 plants per species were equally distributed (Fig. 2.1B).

2.1.2.3.2. Drought treatment

The application of drought treatment started 4 weeks after sowing. The implementation of drought marked the day 0 of the experiment and began with all the pots at field capacity. The drought treatment was imposed by withholding water until the soil volumetric water content (θ_v) reached 15% of the values measured at field capacity. The θ_v was calculated by the daily difference in weight of the pots (volume of water) divided by the volume of the pots (volume of soil). From that day on, the pots were watered daily with the amount needed to keep the θ_v at 15% (Fig. 2.3). The monoculture of *Trifolium pratense* was the first treatment to reach 15%, taking nine days (37 days after sowing). Subsequently, the experiment was extended until the monoculture of *Agrostis capillaris* reached this percentage, taking 16 days from the start of the drought treatment (44 days after sowing). In the well-watered plants, the θ_v was held at 100%, watering daily. The watering was alternated daily between Hoagland's solution and deionized water.

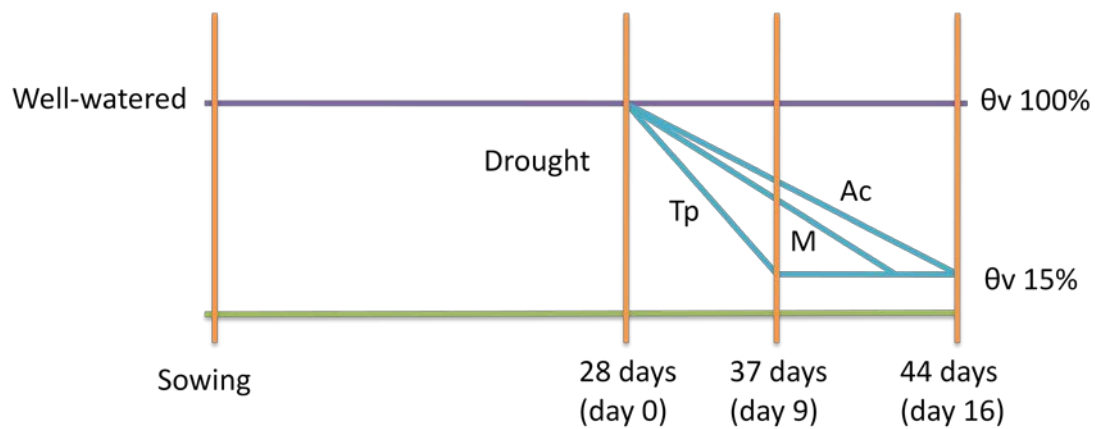


Fig. 2.3. Drought treatment layout (Ac, monoculture of *Agrostis capillaris*; M, mixture; Tp, monoculture of *Trifolium pratense*).

2.1.2.3.3. CO₂ treatment

The CO₂ treatments were: 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (ambient CO₂) and 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (elevated CO₂). The growth chamber atmosphere was maintained at ambient or elevated

CO₂, from sowing throughout growth to the end of the experiment. The CO₂ concentration was monitored by the software of the Conviron PGR15 chamber.

2.1.2.4. Plant material harvest

For quantification of the enzymatic activities and the determination of metabolites and growth, the plant material was harvested on days 0, 9 and 16, after the onset of drought. The plant material was frozen immediately in liquid nitrogen and was stored at -80 °C until use.

2.2. Water relations

2.2.1. Relative soil water content (RSWC)

The relative soil water content was calculated by gravimetric method (Epron, 1997) with some modifications. A soil sample of volume of about 30 mL substrate was taken and weighed at the time of harvest (FW). The fresh weight of the pots kept at field capacity was taken as initial fresh weight (FW_i). Subsequently, the dry weight (DW) was determined drying the substrate at least 48 h in an oven at 105 °C, until reaching a constant weight. The dry weight of the pots kept at field capacity was taken as initial dry weight (DW_i). It is assumed that 100% of relative soil water content is the one which is at field capacity. To avoid errors due to different dry weight of each of the substrate samples, all samples were standardized to the same dry weight. It was calculated by the following formula:

$$RSWC (\%) = 100 \times \frac{(FW - DW)}{\left((DW \times \frac{FW_i}{DW_i}) - DW \right)}$$

2.2.2. Leaf relative water content (RWC)

The leaf relative water content was measured by gravimetric methods. For this, the fresh weight (FW) of a leaf was determined at the harvest. The turgid weight (TW) was calculated in the same leaf after 24 h incubation in deionized water and stored in dark at 4 °C. The dry weight (DW) was subsequently obtained by drying the tissue for at least 48 h in an oven at 80 °C, to constant weight. It was calculated by the following formula:

$$RWC (\%) = 100 \times \frac{(FW - DW)}{(TW - DW)}$$

2.2.3. Water potential (Ψ_w)

The leaf water potential was determined with a Scholander chamber (Plant Water Status Console, Model 3005, Soil Moisture equipment corp., CA, USA) following the procedure described by Scholander et al. (1965). For this, a clean cut was made in the petiole of legumes and in the apical portion of the leaf in the grasses. Quickly, the excised material was put in a rubber-sealing gasket. In the case of grasses, a sheet of filter paper was put between the leaf and the rubber-sealing gasket, so the leaf did not break when pressure was applied. Then, the chamber was sealed and N₂ was applied progressively. The surface of the cut was constantly monitored with a magnifying glass. When the xylematic fluid appeared, the N₂ flow was closed and the pressure reached was written down. This pressure is considered the pressure balance, *i.e.*, the one that balances the negative pressure that retains water in xylem and, therefore, it corresponds to the leaf water potential. The leaf water potential measures were carried out before dawn (Ψ_{wpd}) and six hours after the start of the photoperiod, at midday (Ψ_{wmd}).

2.2.4. Osmotic potential (Ψ_o)

The osmotic potential was measured in the same leaf that was used for the water potential determination, following the procedure of the freezing point of the cellular sap, by a osmometer (Osmomat 030, Gonotec, Alemania) calibrated with a standard solution of NaCl (Gonotec) of $0.3 \text{ osmol kg}^{-1}$.

To obtain the cellular sap, the leaf was cut in segments of the same length and were kept in a 0.5 mL eppendorf tube, previously perforated and put in other eppendorf tube of 1.5 mL of volume (in order to facilitate the subsequent centrifugation and extraction of cellular sap), and then, quickly frozen in nitrogen liquid. The freezing process applied to the sample breaks plant cells and cell walls, thereby negating the turgor potential, so that the measured potential is only for the osmotic potential. Leaf segments were thawed and immediately centrifuged at $13,200 \text{ g}$ for 5 minutes to extract the cell sap, discarding the pellet. Subsequently, $15 \mu\text{L}$ of the cellular sap were taken and osmolarity was measured by osmometer. The osmotic potential was calculated according Wyn Jones & Gorham (1983) by Van't Hoff equation:

$$\Psi_o \text{ (MPa)} = -n \times R \times T$$

where,

$n = \text{osmol kg}^{-1}$ (direct measure from osmometer)

$R = \text{Ideal gas constant, } 0,083 \text{ kg MPa mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

$T = \text{Absolute temperature of the sample, in Kelvin (K)}$

The leaf osmotic potential measures were carried out before dawn (Ψ_{opd}) and six hours after the start of the photoperiod, at midday (Ψ_{omd}).

2.2.5. Turgor potential (Ψ_p)

The turgor potential was calculated by the difference between the leaf water potential and the leaf osmotic potential.

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

The values of the turgor potential were obtained at the same time intervals than in the case of water and osmotic potential: predawn (Ψ_{ppd}) and six hours after the start of photoperiod (Ψ_{pmd}).

2.2.6. Dehydration (DH)

Following the same procedure than for the Ψ_o , the leaf osmotic potential at full turgor (Ψ_o^{100}) was measured. To obtain the full turgor, the leaves were cut and incubated 24 h in deionized water and stored in dark at 4 °C to evade the loss of dry mass by respiration and the synthesis of new dry mass by photosynthesis. The dehydration (DH) was calculated by the following formula:

$$DH \text{ (MPa)} = \Psi_{omd} - \Psi_o^{100}$$

2.2.7. Osmotic adjustment (OA) and osmotic contribution of osmolytes

The osmotic adjustment was calculated by the difference between the Ψ_o^{100} of the droughted plants and the Ψ_o^{100} of the well-watered plants.

$$OA \text{ (MPa)} = \Psi_o^{100} \text{ drought} - \Psi_o^{100} \text{ well-watered}$$

The estimated osmotic contribution of each osmolyte to Ψ_o^{100} was obtained using the van't Hoff equation (Tattini et al., 2002). Osmolytes were assumed to have ideal behavior (Alarcón et al., 1993).

$$\Psi_{\pi sol} \text{ (MPa)} = -0,002479 \times RDW \times C$$

where,

0,002479 = R·T value at 25 °C ($\text{m}^3 \text{ MPa mol}^{-1}$)

RDW = relative dry weight at saturation ($\text{DW}/(\text{TW}-\text{DW})$) (kg m^{-3})

C = molar concentration of the solute (mol kg^{-1})

2.2.8. Proline determination

2.2.8.1. Proline extraction

Aliquots of leaf tissue (20 mg lyophilized) were homogenized with 2 mL sulfosalicylic acid 3% (Bates, 1973). The homogenates were centrifuged at 16,100 g for 5 minutes and the supernatant was kept in ice.

2.2.8.2. Proline quantification

To the above supernatant 0.75 mL of ninhydrin acid was added, consisting of 1.25 g of ninhydrin dissolved in 20 mL of 6 M phosphoric acid and 30 mL of glacial acetic acid. Subsequently, to the mixture of the supernatant and ninhydrin acid, 0.75 mL of glacial acetic acid was added. It was incubated for 1 hour at 100 °C. Once the tubes cooled, 1.5 mL of toluene was added and shaken vigorously for 20 seconds, and then it was decanted. The fluid was separated into two phases, recovering the upper phase. Then, the absorbance was determined at 517 nm (Bates, 1973). A blank was performed with toluene only.

2.2.9. Soluble sugars determination

2.2.9.1. Soluble sugars extraction

Soluble sugars (fructose, glucose, and sucrose) were extracted from freeze-dried leaf tissue (5 mg) in a hydroalcoholic extraction following the procedure described by Pérez-López et al. (2012). It started with the addition of 1 mL of ethanol (80%) and the incubation for 1 h at 4 °C, shaking every 15 minutes. After centrifugation (13,200 *g* for 5 min), the supernatant was collected. The pellet was re-extracted twice, first with ethanol (60%) and then with milli-Q (MQ) water. The pellet was set aside to measure starch content. The supernatants were combined and the suspension was vacuum dried at 45 °C for 2 h (SPD 121P, Speed-Vac, Termo Savant, NY, USA). The residue was resuspended in 500 µL of MQ water.

2.2.9.2. Sugar quantification

Soluble sugars were determined enzymatically using a commercial preparation (Boehringer Mannheim / R-Biopharm Enzymatic Bio Analysis Kit). The kit includes the enzymes necessary for the determination of glucose, fructose and sucrose: glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), hexokinase, glucose-6-phosphate isomerase and fructosidase. The assay, which consists of a set of coupled reactions to NADPH production, is described below (Fig. 2.4):

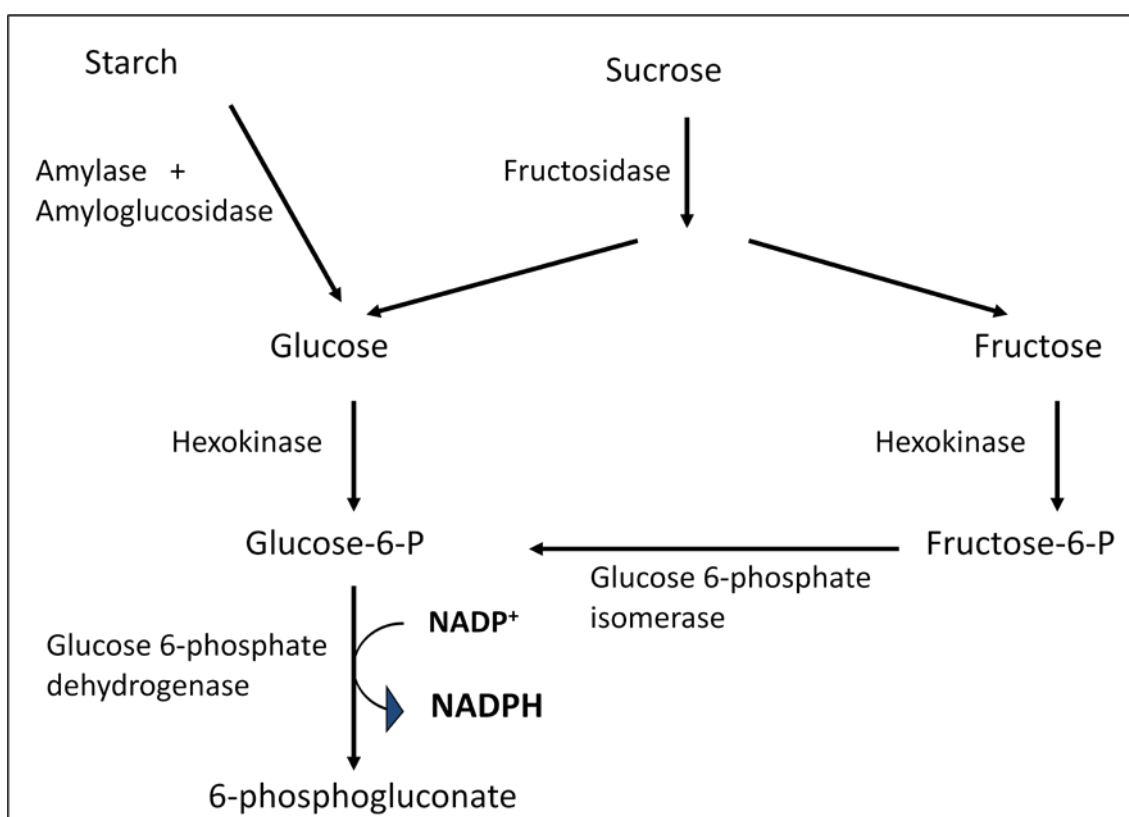


Fig. 2.4. Reaction scheme for determination of soluble sugars concentration.

At pH 7.6 hexokinase catalyzes the phosphorylation of D-glucose by ATP. The D-glucose 6-phosphate formed is oxidized to D-gluconate-6-phosphate by the enzyme G6PDH, using NADP⁺ as cofactor, producing NADPH. The NADPH produced is determined in a spectrophotometer at 340 nm and is stoichiometric to the amount of D-

Materials and methods

glucose initially present in the extract. For the fructose and sucrose determination the same reasoning is used, as detailed in figure 2.4.

2.2.9.2.1. Glucose and fructose determination

Twenty μL of the resuspended extract was taken and incubated with 60 μL of the NADP-ATP solution and 120 μL MQ water. The mixture was shaken for 10 minutes and the absorbance was measured at 340 nm (DO1). Subsequently, 5 μL of enzyme mix (hexokinase and G6PDH; diluted 1:5) was added and it was shaken for 10 minutes and the absorbance was measured at 340 nm (DO2). By subtracting DO1 and DO2 the glucose concentration was determined. Later, to the same mixture (205 μL) 5 μL of glucose-6-phosphate isomerase, diluted 1:5, was added. This enzyme allowed the conversion of the fructose 6-P to glucose 6-P. It was shaken for another 10 minutes and the absorbance was measured at 340 nm (DO3). The difference between DO2 and DO3 allowed the quantification of fructose. The absorbance data were converted into glucose, using a glucose standard curve up to 1mM ($\text{Abs}_{340} = 1.67 \text{ M} + 0.0028$; $R^2=0.9995$).

2.2.9.2.2. Sucrose determination

Another 20 μL of extract was incubated with 10 μL fructosidase for 20 minutes at 30 ° C and continuous shaking, in order to hydrolyze the sucrose into glucose and fructose. Subsequently, 60 μL of the NADP-ATP solution and 120 μL of MQ water were added. It was shaken for 10 minutes and the absorbance was determined at 340 nm (DO1). Then, 5 μL of enzyme mix (hexokinase and G6PDH; diluted 1:5) was added and it was shaken for 10 minutes and the absorbance was measured at 340 nm (DO2). By subtraction between DO2 and DO1, glucose and sucrose concentration were determined jointly. To this value, the glucose concentration obtained above was subtracted to obtain

the sucrose concentration. The absorbance data were converted into sucrose, using a sucrose standard curve up to 1mM ($Ab_{S_{340}} = 0.99 M + 0.0023$; $R^2=0.9996$).

2.2.10. Volumetric elasticity modulus (ϵ)

The volumetric elasticity modulus (ϵ) was estimated assuming a near linear relationship between turgor potential and RWC using the method of Rivelli et al. (2002).

$$\epsilon(MPa) = \frac{\Delta P}{\Delta V/V}$$

where,

ΔP is the variation in turgor potential between growth conditions and full turgor conditions.

$$\Delta P = (\Psi_o^{100} = \Psi_p^{100}) - \Psi_p$$

$\Delta V/V$ is approximated from values for the difference in RWC between fresh and fully hydrated tissue (RWC^{100}).

$$\Delta V/V = \frac{(RWC^{100} - RWC)}{100}$$

2.2.11. Whole-plant transpiration

Whole-plant transpiration was calculated by gravimetric method. Each pot was weighed daily at the same time, before and after water (De Luis et al., 1999). Thus, the water loss in 24 hours per pot was obtained.

2.2.12. Hydraulic conductance (HC)

Hydraulic conductance (HC) was estimated for individual plants by dividing the instantaneous transpiration rate (E), by the difference between the measured predawn leaf water potential (Ψ_{wpd}) minus the midday leaf water potential (Ψ_{wmd}) (Johnson et al., 2002).

$$HC \text{ (g H}_2\text{O cm}^{-2}\text{d}^{-1}\text{MPa}^{-1}) = \frac{E}{\Psi_{wpd} - \Psi_{wmd}}$$

2.3. Photosynthetic metabolism

2.3.1. Gas exchange parameters

The determination of gas exchange parameters was performed by the gas analyzer in the infrared (IRGA) in open system Li-6400 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA). Measurements were performed 3 h after dawn with a cuvette at a stable temperature of 24 °C and a relative humidity of 60%. The photosynthetic photon flux density was 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, provided by a red/blue LED light source (model Li 6400-02B, Li-Cor Inc.). The CO_2 concentration of the cuvette was the same as in the growth conditions. The measurement record was made when the equilibrium of water and CO_2 exchange

(steady state) was reached, a condition that was obtained after 15 minutes. CO₂ assimilation rate (*A*), stomatal conductance (*g_s*), intercellular CO₂ concentration (*C_i*), the instantaneous transpiration rate (*E*) and the instantaneous water use efficiency (*ITE*) were determined according to the method of von Caemmerer and Farquhar (1981). The parameters were calculated based on the following formulas:

$$A (\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}) = \frac{F \cdot (C_r - C_s)}{100S} - (C_s \cdot E)$$

$$g_s (\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}) = \frac{1}{\left(\frac{1}{g_{tw}} - \frac{k_f}{g_{bw}}\right)}$$

$$C_i (\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ air}) = \frac{\left(g_{tc} - \frac{E}{2}\right) \cdot C_s - A}{g_{tc} + \frac{E}{2}}$$

$$E (\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}) = \frac{F \cdot (W_s - W_r)}{100 \cdot S \cdot (1000 - W_s)}$$

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

where,

F = air flow rate (μmol s⁻¹)

C_r = reference CO₂ concentration (μmol CO₂ mol⁻¹ air)

C_s = sample CO₂ concentration (μmol CO₂ mol⁻¹ air)

g_{tw} = total conductance to water vapor (mol H₂O m⁻² s⁻¹)

g_{bw} = boundary layer conductance to water vapor (mol H₂O m⁻² s⁻¹)

k_f = (K²+1)/(K+1)². Being *K* a dimensionless coefficient which estimates the fraction of conductances of one side of the leaf to the other.

Materials and methods

g_{tc} = total conductance to CO₂ (mol CO₂ m⁻² s⁻¹)

S = leaf area (cm²)

W_r = reference water mole fraction (mmol H₂O mol⁻¹ air)

W_s = sample water mole fraction (mmol H₂O mol⁻¹ air)

2.3.2. Chlorophyll a fluorescence determination

Chlorophyll *a* fluorescence was determined using the open gas exchange system, Li-6400 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA), with an integrated fluorescence chamber head (Li-6400-40; Li-Cor Inc.).

Measurements were made before dawn, consequently, the plants were adapted to darkness and all energy-dependent fluorescence quenching coefficients were relaxed. The leaves were exposed to different light pulses. First, the basal dark-adapted fluorescence signal (F_0) was determined with a 660 nm output of 0.25 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ set at a frequency of 500 Hz. Later, the maximum dark-adapted fluorescence (F_m) was measured with a saturating flash of 7,800 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 0.8 s. Actinic illumination was provided by light at 400 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. During exposure to actinic illumination, we induced a transient closure of PSII photochemical reaction centers by applying saturating pulses every 15 s until a steady state of variable fluorescence (F_t) was achieved and the maximum light-adapted fluorescence (F_m') was recorded. At that point, the actinic light was switched off to allow maximum oxidation of the PSII electron acceptor, and a far-red (735 nm) light intensity of 5.88 mW s^{-1} was applied for 10 s, measuring the basal light-adapted fluorescence (F_0'). The following parameters were calculated:

The photochemical efficiency of PSII in dark-adapted leaves (F_v/F_m) indicates the maximum proportion of light absorbed by the antenna that reaches the reaction

center in dark-adapted conditions, where all the photochemical components are oxidized. In addition, it determines the photoinhibition of PSII (Krause & Weis, 1991).

$$Fv/Fm = \frac{(Fm - F_0)}{Fm}$$

The photochemical efficiency of PSII in light-adapted leaves (Fv'/Fm') indicates the proportion of light absorbed by the antenna that reaches the reaction center in light-adapted conditions. In these conditions, some of the components are reduced, so the values are lower.

$$Fv'/Fm' = \frac{(Fm' - F_0')}{Fm'}$$

The photochemical quenching (qP) indicates the proportion of energy in the reaction center that is used in photochemical processes. Thus, it measures the redox state of the electron transporters (Demmig-Adams & Adams, 1996).

$$qP = \frac{(Fm' - F_t)}{(Fm' - F_0')}$$

The non-photochemical quenching (NPQ) indicates the level of non-radiative energy dissipation in the light-harvesting antenna of PSII, principally as heat (Demmig-Adams & Adams, 1996).

$$NPQ = \frac{(Fm - Fm')}{Fm'}$$

The actual quantum yield of PSII (Φ_{PSII}) indicates the proportion of light absorbed by the antenna that reaches the reaction center and, then, it is used in photochemical processes. Thus, it is equivalent to the proportion of energy used in the photochemical processes of the photosynthesis (Genty et al., 1989).

$$\Phi_{PSII} = qP \times Fv'/Fm' = \frac{(Fm' - F_t)}{Fm'}$$

The electron transport rate (*ETR*) indicates the proportion of light used in photochemical processes from the total of energy that reach the leaf per unit of time and surface (PPFD). The absorption coefficient of the leaves was considered 0.85 and the fraction of the excitation energy distributed to PSII was considered 0.5 (Genty et al., 1989).

$$ETR = \Phi_{PSII} \times PPFD \times 0,85 \times 0,5$$

2.3.3. Photosynthetic pigments determination

Quantification of photosynthetic pigments in legumes was conducted in three leaf discs of 0.25 cm radius. In the case of grasses, three leaves fragments of 0.5 cm long were used and the width of each was recorded. In both cases, the samples were weighed. Chlorophylls and carotenoids were extracted in dimethylsulfoxide (DMSO) as Barnes et al. (1992). The samples were incubated in 2 mL of DMSO for 2 h in the dark, in an oven at 80 °C. Subsequently, the supernatant was poured into spectrophotometer cuvettes, avoiding falling discs, and the absorbance was measured at 750, 665, 649 and 480 nm. Measuring absorbance at 750 nm is used to control the degree of turbidity of extract. When this value was less than 0.02, the measure was taken as valid, discarding the measures with higher values. The following formulas as Wellburn (1994) were used:

$$\text{Chlorophyll } a \text{ } (\mu\text{g/mL}) = 12.47A_{665} - 3.62A_{649}$$

$$\text{Chlorophyll } b \text{ } (\mu\text{g/mL}) = 25.06A_{649} - 6.5A_{665}$$

$$\text{Carotenoids } (\mu\text{g/mL}) = \frac{(1000A_{480} - 1.29Chla - 53.78Chlb)}{220}$$

The chlorophyll and carotenoid concentration were expressed on a dry weight basis, mg g^{-1} DW.

2.3.4. Starch determination

2.3.4.1. Starch extraction

The extraction method was explained in the 2.2.9.1. section.

2.3.4.2. Starch quantification

Starch was extracted from the pellet of the extraction procedure. First, the pellet was dried for 1 hour in the oven at 50 °C, then, the pellet was redissolved in 1 mL of MQ water and incubated at 100 °C for 2 h. Next, the starch was digested with amyloglucosidase (85 U) and amylase (20 U) in a 0.2 M acetic acid buffer (pH 4.8). This mix was incubated at 50 °C for 3 h, after which the mixture was centrifuged at 13,200 g for 15 min. The starch was measured in the supernatant, following the same procedure than for the glucose quantification. So, 20 μL of the supernatant were taken and incubated with 60 μL of the NADP-ATP solution and 120 μL MQ water. The mixture was shaken for 10 minutes and the absorbance was measured at 340 nm (DO1).

Materials and methods

Subsequently, 5 μL of enzyme mix (hexokinase and G6PDH; diluted 1:5) was added and it was shaken for 10 minutes and the absorbance was measured at 340 nm (DO2). By subtracting DO1 and DO2 the glucose concentration was determined. Later, to the same mixture (205 μL) 5 μL of glucose-6-phosphate isomerase, diluted 1:5, were added. This enzyme allowed the conversion of the fructose 6-P to glucose 6-P. It was shaken for another 10 minutes and the absorbance was measured at 340 nm (DO3). The difference between DO2 and DO3 allowed the quantification of fructose. The absorbance data were converted into glucose, using a glucose standard curve up to 1 mM ($\text{Abs}_{340} = 1.67 \text{ M} + 0.0028$; $R^2=0.9995$).

2.3.5. Rubisco activity determination (EC 4.1.1.39)

2.3.5.1. Rubisco extraction

Leaf tissues were frozen and held at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analyzed. Aliquots of leaf tissue (0.08 g fresh weight) were ground using a cold mortar and a pestle with 3 mL extraction buffer. The extraction buffer consisted of 100mM Bicine pH 7.8, 10 mM MgCl_2 , 1 mM ethyleneglycoltetraacetate (EGTA), 1 mM ethylenediaminetetraacetate (EDTA), 1 mM aminocaproic, 1 mM benzamidine, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.5 mM Dithiotreitol (DTT), 1% Triton X-100 (v/v), 0.25% Bovine serum albumin (BSA) (w/v) and 20% glycerol (v/v). The mix was centrifuged 1 minute at 16,100 g.

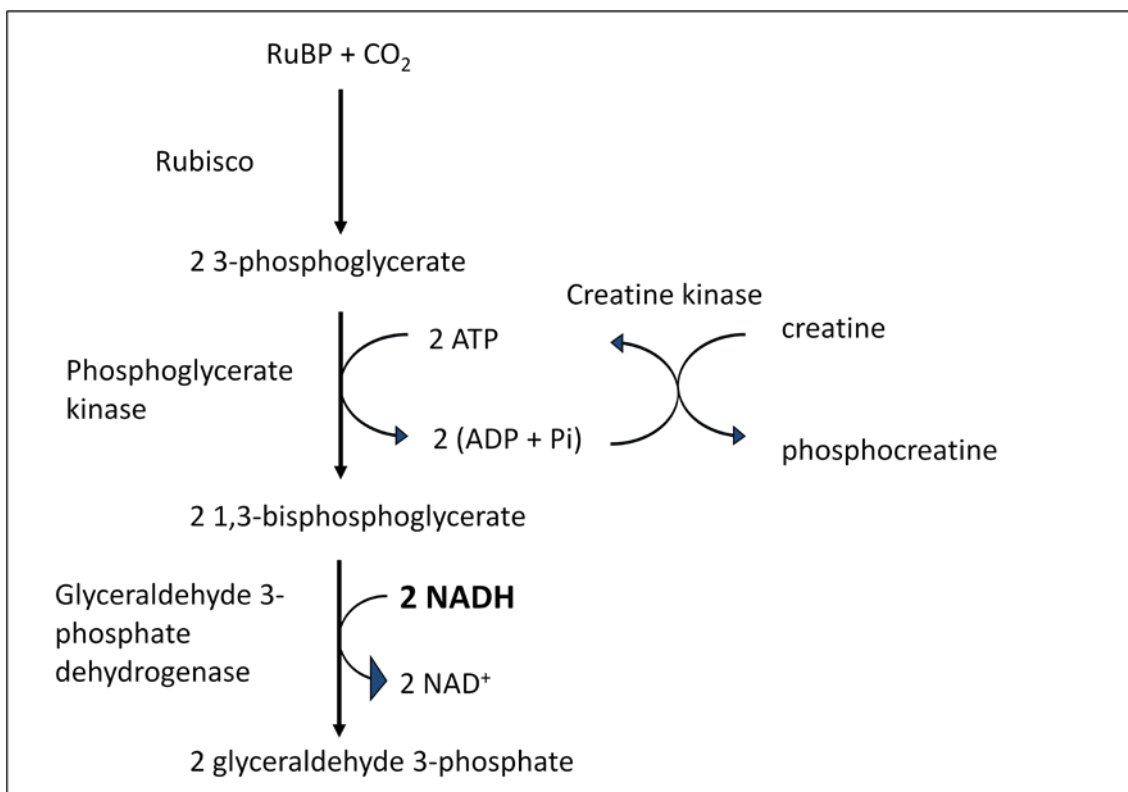


Fig. 2.5. Reaction scheme for determination of Rubisco activity.

2.3.5.2. Rubisco quantification

The method described by Sharkey et al. (1991) with some modifications (Pérez et al., 2005) was used. Activity was measured by coupling the activity of Rubisco to NADH oxidation using Phosphoglycerate kinase (PGK; EC 2.7.2.3) and Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH; EC 1.2.1.12) (Fig. 2.5).

To obtain the substrate of the G3PDH enzyme, the reaction was coupled to the reaction catalyzed by the PGK. This reaction is highly dependent on the concentration of ADP, which is an inhibitor. Therefore, a high ATP/ADP balance is maintained by coupling the reaction catalyzed by creatine kinase (CK; EC 2.7.3.2). The reaction is linear for 30-60 seconds and the slope of this line is proportional to the enzyme activity, considering that the stoichiometry between NADH oxidation and carboxylation substrate Rubisco (ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP)) is 2:1 (Fig 2.5).

Materials and methods

Twenty μL of the supernatant was used to measure the initial activity in a reaction medium consisted of 100mM Bicine pH 8.2, 20 mM MgCl_2 , 18 mM KCl, 10 mM NaHCO_3 , 5 mM phosphocreatine, 1 mM EDTA, 1 mM ATP, 0.6 mM RuBP, 0.2 mM NADH, 10 mM DTT, 0.2% BSA (w/v) and the enzymes PGK (47 U mL^{-1}), G3PDH (47 U mL^{-1}) y CK (25 U mL^{-1}). The enzymes, which were dissolved in ammonium sulphate, were centrifuged and the pellet dissolved in 20% glycerol. Care was taken to keep all solutions as close to 0°C as possible during the preparation of the samples for initial activity measurement. The oxidation of NADH was monitored measuring the absorbance at 340 nm.

Twenty μL of the supernatant was used to measure the total activity. First, the extract was incubated for 10 minutes at room temperature in activation medium, consisted of 100mM Bicine pH 8.2, 20 mM MgCl_2 , 20 mM NaHCO_3 , and 0.2% BSA (w/v). After the incubation the same reaction medium than for the initial activity was added and the oxidation of NADH was monitored measuring the absorbance at 340 nm.

2.4. Antioxidant metabolism

2.4.1. Superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) activity determination

2.4.1.1. SOD extraction

All operations were carried out at $0\text{--}4^\circ\text{C}$. Aliquots of leaf tissue (0.15 g fresh weight) were ground in a cold mortar, using an extraction buffer (3 mL). The extraction buffer consisted of 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 0.1 mM EDTA, 0.2% Triton X-100, 1 mM PMSF, and 2 mM DTT. The homogenates were squeezed through two layers of muslin, centrifuged at $16,100 \text{ g}$ for 25 minutes and the supernatant was gel-filtered over Shepadex G-25 columns (NAPTM-10, Amersham Biosciences, Sweden) which had been equilibrated with 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 0.1 mM EDTA and 0.2% (v/v) Triton

X-100. The columns were reused after passing through them 1.5 mL of 50 mM NaOH and 30 mL of equilibration buffer.

2.4.1.2. SOD activity quantification

SOD activity was assayed by the ferricytochrome-c reduction spectrophotometric test, using xanthine/xanthine oxidase as the source of superoxide radicals (McCord & Fridovich, 1969).

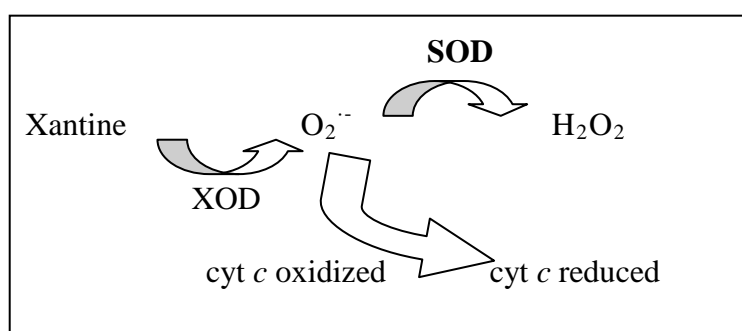


Fig. 2.6. Reaction scheme for determination of superoxide dismutase activity.

The reaction mixture (280 μ L) contained 50mM potassium phosphate (pH 7.8), 0.1mM EDTA, 1 mM cyt-c and 1 mM xanthine. This medium was bubbled with air for 20 minutes to achieve complete oxidation of cytochrome c. Then, 10 μ L of xanthine oxidase (XOD) was added to the reaction mixture and the reduction rate of cyt-c in the absence of supernatant was monitored at 550 nm. This value was *circa* 0.025 $\Delta Abs_{550} \text{ min}^{-1}$ and served as a control (P_b). Later, 10 μ L of XOD and 10 μ L of the extract were added to the reaction mixture and the reduction rate of cyt-c in the absence of supernatant was monitored at 550 nm (P_m). One unit of SOD was defined as the amount of enzyme that inhibited the rate of ferricytochrome-c reduction by 50%. The SOD activity was expressed as $U \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$. The inhibition was calculated by the following formula:

$$\text{inhibition \%} = 100 \times \left(\frac{P_b - P_m}{P_b} \right)$$

2.4.2. Catalase (CAT; EC 1.11.1.6) activity determination

2.4.2.1. CAT extraction

The extraction method was explained in the 2.4.1.1. section.

2.4.2.2. CAT activity quantification

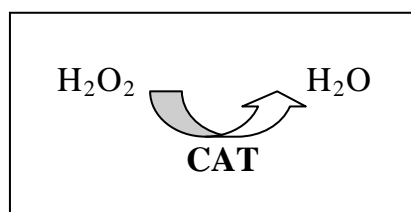


Fig. 2.7. Reaction scheme for determination of catalase activity.

CAT activity was measured spectrophotometrically according to Aebi (1984), by monitoring the disappearance of H_2O_2 at 240 nm for 6 minutes at 25 °C. The reaction mixture contained 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7), 20 mM H_2O_2 and 5 μ L of the supernatant was added to start the reaction. Until quantification, H_2O_2 remained in dark conditions. A standard curve using H_2O_2 up to 20 mM was used to convert the absorbance into H_2O_2 concentration ($Abs_{240} = 0.0312 \text{ mM} - 0.0012$; $R^2=0.9999$). The CAT activity was expressed as $\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$.

2.4.3. Ascorbate peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) activity determination

2.4.3.1. APX extraction

All operations were carried out at 0–4 °C. Aliquots of leaf tissue (0.12 g fresh weight) were ground in a cold mortar, using an extraction buffer (3 mL). The extraction buffer consisted of 50 mM (pH 7.8) potassium phosphate buffer, containing 2% polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) (w/v), 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 0.2% Triton X-100 (v/v), 5 mM cysteine, and 2 mM of ascorbate (Asa). Asa was added to the medium to avoid inactivation of APX during extraction and assay. The homogenates were squeezed through two layers of muslin and centrifuged at 16,100 g for 25 minutes.

2.4.3.2. APX activity quantification

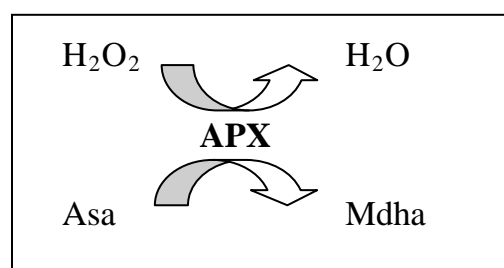


Fig. 2.8. Reaction scheme for determination of ascorbate peroxidase activity.

APX activity was assayed by measuring the oxidation of Asa at 290 nm according to Hossain & Asada (1984). The reaction mixture contained 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (Hepes) (pH 6.6) and 0.8 mM Asa. The oxidation rate of Asa, measured as the decline in absorbance at 290 nm, was estimated between 1 and 60 s after starting the reaction with the addition of 0.8 mM H₂O₂ (10 μL) and 10 μL of the supernatant. Corrections were made for the non-enzymatic oxidation of ascorbate by H₂O₂ and for the oxidation of ascorbate in the absence of H₂O₂. A standard curve using

Asa up to 200 μM was used to convert the absorbance into Asa concentration ($\text{Abs}_{265} = 1.9782 \text{ mM}$; $R^2=0.9981$). The APX activity was expressed as $\text{nmol Asa mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$.

2.4.4. Monodehydroascorbate reductase (MDHAR; EC 1.6.5.4) activity determination

2.4.4.1. MDHAR extraction

All operations were carried out at 0–4 °C. Aliquots of leaf tissue (0.15 g fresh weight) were ground in a cold mortar, using an extraction buffer (3 mL). The extraction buffer consisted of 50 mM (pH 7.8) potassium phosphate buffer, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 2% PVPP (w/v), 0.2% Triton X-100 (v/v), and 5 mM cysteine. The homogenates were squeezed through two layers of muslin and centrifuged at 16,100 g for 25 minutes.

2.4.4.2. MDHAR activity quantification

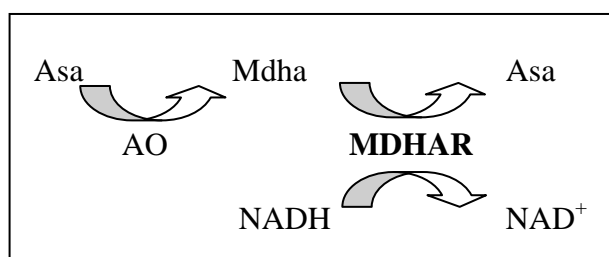


Fig. 2.9. Reaction scheme for determination of monodehydroascorbate reductase activity.

MDHAR activity was measured according to Arrigoni et al. (1992) at 25 °C by monitoring the decrease in absorbance at 340 nm because of the oxidation of NADH. The reaction mixture consisted of 50 mM potassium phosphate (pH 7.2), 0.2 mM

NADH, and 2 mM Asa. The reaction was initiated by the addition of 1.1 U (5 μ L) ascorbate oxidase (AO), which generated saturating concentration of monodehydroascorbate (Maha), and 10 μ L of the extract. A standard curve using NADH up to 200 μ M was used to convert the absorbance into NADH concentration ($Abs_{340} = 3.988 \text{ mM} - 0.005$; $R^2=0.9972$). The MDHAR activity was expressed as nmol NADH oxidized $\text{mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$.

2.4.5. Dehydroascorbate reductase (DHAR; EC 1.8.5.1) activity determination

2.4.5.1. DHAR extraction

The extraction method was explained in the 2.4.4.1. section.

2.4.5.2. DHAR activity quantification

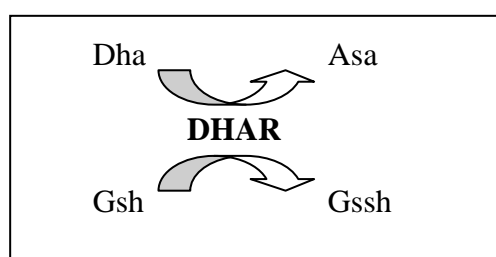


Fig. 2.10. Reaction scheme for determination of dehydroascorbate reductase activity.

DHAR activity was determined according to Gillham and Dodge (1986), monitoring Asa formation via dehydroascorbate (Dha) reduction at 265 nm. The reaction mixture consisted of 50 mM potassium phosphate (pH 6.6), 2.5 mM

Materials and methods

glutathione reduced (Gsh), and 0.1 mM EDTA. The reaction was initiated by adding 10 μ L of Dha (0.2 mM) and 10 μ L of the extract to the reaction mixture. The reaction rate was corrected for the non-enzymatic reduction of Dha by Gsh. A standard curve using Asa up to 100 μ M was used to convert the absorbance into Asa concentration ($\text{Abs}_{290} = 10.095 \text{ mM}$; $R^2=0.9964$). The DHAR activity was expressed as $\text{nmol Asa mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$.

2.4.6. Glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2) activity determination

2.4.6.1. GR extraction

The extraction method was explained in the 2.4.1.1. section.

2.4.6.2. GR activity quantification

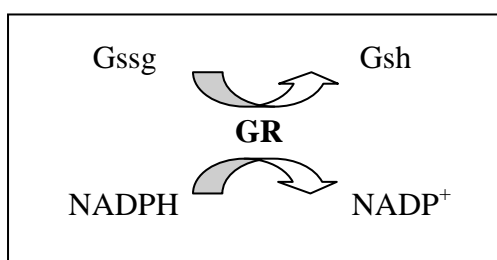


Fig. 2.11. Reaction scheme for determination of glutathione reductase activity.

GR activity was measured according to Edwards et al. (1990). The Gssg (oxidized glutathione)-dependent oxidation of NADPH was monitored by the decrease in absorbance at 340 nm at 25 °C. The reaction mixture contained 100 mM Hepes (pH 7.8), 1 mM EDTA, 3 mM MgCl_2 and 0.5 mM Gssg. The reaction was initiated by

the addition of NADPH (0.2 mM) and supernatant (30 μ L). Corrections were made for the non-enzymatic reduction of Gssg by NADPH. A standard curve using NADPH up to 200 μ M was used to convert the absorbance into NADPH concentration ($Abs_{340} = 3.8831 \text{ mM}; R^2=0.9994$). The GR activity was expressed as nmol NADPH $\text{mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$.

2.4.7. Reduced ascorbate (Asa) and oxidized ascorbate (Dha) determination

2.4.7.1. Ascorbate extraction

All operations were carried out at 0–4 °C. Previously frozen fresh leaf samples (0.16 g) were homogenized in 2 mL of 3% HCl and 1 mM EDTA using a cold mortar and pestle and centrifuged at 16,100 g for 10 minutes.

2.4.7.2. Asa and Dha quantification

Asa and Dha were measured as described by Foyer et al. (1995) with some modifications. The supernatant (100 μ L for *Trifolium pratense* and 200 μ L for *Agrostis capillaris*) was neutralized with 200 μ L of 1 M succinate buffer and 0.5 M KOH and 600 μ L of MQ water. The absorbance at 265 nm was measured and that was the initial measurement.

Asa was measured by the decrease in absorbance at 265 nm after adding 1 U mL^{-1} of AO. After 10 minutes, the absorbance was recorded and this was the final measurement. The Asa concentration was calculated by difference between the initial and final measurements.

Materials and methods

Dha was measured by the increase in absorbance at 265 nm after adding 30 μL DTT (300 mM). After 10 minutes, the absorbance was recorded and this was the final measurement. The Dha concentration was calculated by difference between the initial and final measurements.

A standard curve using Asa up to 200 μM was used to convert the absorbance into ascorbate concentration ($\text{Abs}_{265} = 0.0026 \mu\text{M} + 0.0213$; $R^2=0.9994$). The ascorbate concentration was expressed as $\mu\text{mol ascorbate g}^{-1}\text{DW}$.

2.4.8. Reduced glutathione (Gsh) and oxidized glutathione (Gssg) determination

2.4.8.1. Glutathione extraction

The extraction method was explained in the 2.4.7.1. section.

2.4.8.2. Gsh and Gssg quantification

Total (Gsh + Gssg) and Gssg were determined in the supernatant of the centrifuged extract by the 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic) acid-glutathione reductase (DTNB-GR) recycling procedure (Griffith, 1980).

Total glutathione was measured by neutralizing 200 μL of the supernatant with 350 μL of 1 M succinate buffer, 0.5 M KOH and 350 μL of 250 mM Tris buffer (pH 7) containing EDTA (6.3 mM) and NADPH (0.32 mM). Next, 100 μL of 6 mM DTNB and 0.1 U of GR were added. Changes in absorbance at 412 nm were measured at 25 $^{\circ}\text{C}$.

Gssg was determined after Gsh derivatization by 2-vinylpyridine, then, the same procedure as mentioned above was made. Gsh was determined by subtracting Gssg from the total Gsh content.

A standard curve using Gsh up to 150 μM was used to convert the absorbance into glutathione concentration ($\text{Abs}_{412} = 0.0278 \mu\text{M}$; $R^2=0.999$). The glutathione concentration was expressed as $\mu\text{mol glutathione g}^{-1}\text{DW}$.

2.4.9. Lipid peroxidation (Mda) determination

2.4.9.1. Mda Extraction

The extraction method was explained in the 2.4.3.1. section.

2.4.9.2. Mda quantification

Lipid peroxidation was determined by measuring malondialdehyde (Mda) formed using the thiobarbituric acid method described by Buege & Aust (1978) with some modifications by Hodges et al. (1999). The crude extract preparation (200 μL) was mixed with 1000 μL of solution containing 15% trichloroacetic acid (TCA) and 0.01% butylated hydroxytoluene (BHT) with (+TBA) and without (-TBA) 0.375% (w/v) thiobarbituric acid (TBA). The mixture was heated at 100 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min and the reaction was stopped by quickly placing it in an ice-bath. The cooled mixture was centrifuged at 2,000 g for 5 minutes, and the absorbance of the supernatant was read at 440, 532 and 600 nm. The Mda concentration was determined by the extinction coefficient of $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ after subtracting non-specific absorbance at 600 nm and sugar absorbance at 440 nm, using the following formula:

$$A = (A_{532+TBA} - A_{600+TBA}) - (A_{532-TBA} - A_{600-TBA})$$

$$B = 0.0571 \times (A_{440+TBA} - A_{600+TBA})$$

$$Mda = 155 \times (A - B)$$

where, 0.0571 is the molar absorbance ratio of sucrose at 532 and at 440 nm. $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ is the molar extinction coefficient for Mda. The Mda concentration was expressed as $\mu\text{mol Mda cm}^{-2}$.

2.5. Mineral content

2.5.1. Extraction and determination of macro- and micronutrients

The mineral nutrients were determined in a homogenous mix of at least 3 independent plants with 3 replicates per treatment and per organ. The dry material was milled with a vibration mill (Model MM301, Fisher Bioblock Scientific) with a continuous shaken 30 s^{-1} for 3 minutes. To determine the carbon (C) and nitrogen (N) concentrations, 2 mg DW were determined using an elemental analyzer (FlashEA 1112; ThermoFinnigan, Germany). Subsequently, calcium (Ca), magnesium (Mg), potassium (K), and phosphorus (P) were quantified using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICPAES; Yobin Yvon Activa, Horiba, Edison, NJ, USA).

2.5.2. Nutrient uptake rate

The nutrient uptake rates (XUR) were calculated based on equation described by Franklin & Zwiazek (2004).

$$XUR(\text{mg M g}^{-1}\text{DW}_{\text{root}} \text{d}^{-1}) = \frac{(M_{\text{tot}2} - M_{\text{tot}1}) \times \left(\ln\left(\frac{\text{DW}_{\text{root}2}}{\text{DW}_{\text{root}1}}\right)\right)}{(\text{DW}_{\text{root}2} - \text{DW}_{\text{root}1}) \times (T_2 - T_1)}$$

where,

$M_{\text{tot}1}$ = whole-plant mineral content at time 1 in mg

$M_{\text{tot}2}$ = whole-plant mineral content at time 2 in mg

$\text{DW}_{\text{root}1}$ = root dry weight at time 1 in g

$\text{DW}_{\text{root}2}$ = root dry weight at time 2 in g

$T_2 - T_1$ = Time interval in days

2.6. Growth parameters

2.6.1. Absolute growth parameters determination

The plants were harvested and separated into leaves, stems, and roots in the day 0, day 9, and day 16 after the onset of drought treatment. The following parameters were determined: fresh weight, dry weight, and leaf area. The samples were dried at 80 °C for 48 h; then, the dry weight (DW) was determined. The leaf area was determined using Winfolia software (Regent Instruments Inc., Canada) associated to a scanner (Epson expression 10000 XL).

2.6.2. Relative growth parameters determination

From the absolute growth parameters, the following relative growth parameters were calculated according to Beadle (1993).

2.6.2.1. Relative growth rate (RGR)

Relative growth rate (RGR) is considered as the increase in biomass per unit plant weight already present and per unit of time. It is calculated by the following formula:

$$RGR \text{ (mg DW g}^{-1} \text{ DW d}^{-1}) = \frac{\ln(DW_2/DW_1)}{T_2 - T_1}$$

where,

DW_1 = whole-plant dry weight at time 1

DW_2 = whole-plant dry weight at time 2

$T_2 - T_1$ = Time interval in days

Additionally, RGR could be factorized into the net assimilation rate (NAR; functional component) and the leaf area ratio (LAR; morphological component).

2.6.2.2. Net assimilation rate (NAR)

The net assimilation rate (NAR) is considered as the net balance of C-gain in photosynthesis and C-losses in shoot and root respiration, divided by the C-concentration of the plant's newly formed biomass. It is calculated by the following formula:

$$NAR \text{ (g DW m}^{-2} \text{ d}^{-1}) = \left(\frac{DW_2 - DW_1}{A_2 - A_1} \right) \times \left(\frac{\ln(A_2/A_1)}{T_2 - T_1} \right)$$

where A_1 and A_2 are the leaf area at time 1 and at time 2, respectively. The other parameters have been defined above.

2.6.2.3. Leaf area ratio (LAR)

The leaf area ratio (LAR) indicates the amount of leaf area per unit total plant weight; thus, it indicates the size of the photosynthetic surface compared to the total respiratory biomass. It is calculated by the following formula:

$$LAR \text{ (m}^2 \text{ kg}^{-1} \text{ DW)} = \left(\frac{A_2 - A_1}{DW_2 - DW_1} \right) \times \left(\frac{\ln(DW_2/DW_1)}{\ln(A_2/A_1)} \right)$$

LAR can be further analyzed as the product of specific leaf area (SLA; leaf area per unit leaf mass) and leaf weight ratio (LWR; leaf mass versus total plant mass).

where,

$$LWR \text{ (g DW g}^{-1} \text{ DW)} = \left(\frac{DW_{leaf\ 2} - DW_{leaf\ 1}}{DW_2 - DW_1} \right) \times \left(\frac{\ln(DW_2/DW_1)}{\ln(DW_{leaf\ 2}/DW_{leaf\ 1})} \right)$$

$$SLA \text{ (m}^2 \text{ g}^{-1} \text{ DW)} = \left(\frac{A_2 - A_1}{DW_{leaf\ 2} - DW_{leaf\ 1}} \right) \times \left(\frac{\ln(DW_{leaf\ 2}/DW_{leaf\ 1})}{\ln(A_2/A_1)} \right)$$

2.6.3. Competition index

To determine the competitiveness of the species, the relative competition intensity (RCI) was calculated (Grace, 1995).

$$RCI = \frac{(Biomass_{monoculture} - Biomass_{mixture})}{Biomass_{monoculture}}$$

Where $Biomass_{monoculture}$ is the total biomass per plant of a species grown in monoculture, and $Biomass_{mixture}$ is the total biomass per plant of the same species grown in mixture. An RCI value of 0 indicates that there is no effect; a positive value indicates competition, *i.e.* the growth in mixture is lower than in monoculture, and a negative value indicates facilitation, showing a higher biomass in mixture than in monoculture.

2.7. Forage quality

2.7.1. Fiber concentration and in vitro dry matter digestibility

The samples were analyzed for neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), and lignin concentration using a near infrared reflectance spectroscopy instrument (FT-NIR MPA model; Bruker Scientific Instrument, Billerica, MA, USA). Hemicellulose concentration was calculated as the difference between NDF and ADF, while cellulose concentration was calculated as the difference between ADF and lignin.

The *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) was determined by the cellulase ONOZUKA R-10 method (McLeod & Minson, 1980).

2.7.2. Total proteins determination

2.7.2.1. Total proteins extraction

The extract used for quantification of proteins was the same as the one used for the enzymatic measurement of APX, as detailed in 2.4.3.1.

2.7.2.2. Total proteins quantification

For the protein quantification, 10 μL of the above supernatant and 590 μL of Bradford reagent (BIO-RAD Protein Assay) were used. The Bradford reagent was previously diluted with MQ water (1.2:4.6). The reaction was kept for 10 minutes in dark, and the absorbance at 595 nm was measured (Bradford, 1976). The protein concentration was determined on a dry weight basis, $\text{mg prot g}^{-1} \text{ DW}$, using bovine serum albumin as a standard ($\text{Abs}_{595} = 0.31 \text{ mg prot mL}^{-1} + 0.0123$; $R^2=0.998$).

2.8. Statistical analysis

Results are reported as the mean \pm standard error (SE) of three independent experiments (three experiments under ambient CO_2 and three experiments under elevated CO_2) in the four species experiment, and in the case of the two species experiment, four independent experiments were carried out (four experiments under ambient CO_2 and four experiments under elevated CO_2). In each experiment, we measured at least three different replicates (plants). At each CO_2 concentration, each of the measured physiological parameters remained statistically similar between the three independent experiments; therefore, we pooled the measurements from the three experiments in each condition. The SE was directly calculated from crude data. Data

Materials and methods

analyses were performed using the SPSS 19.0 software package (Chicago, IL). Three-way analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the main effects of drought, CO₂ concentration, competition and their interactions on all dependent variables. Means were compared using Duncan's multiple range test. *P*-values ≤ 0.05 were considered statistically significant. Prior to analyses, we tested whether the assumptions of an ANOVA, homogeneity of variances and normally distributed errors were achieved. The homogeneity of variances for all the studied parameters was evaluated by Levene's test and the distribution of the residuals was assessed by Kolmogorov–Smirnov test.

3. The type of competition modulates the ecophysiological response of grassland species to elevated CO₂ and drought

Datos publicados en: Miranda-Apodaca, J., Pérez-López, U., Lacuesta, M., Mena-Petite, A., Muñoz-Rueda, A., 2015. The type of competition modulates the ecophysiological response of grassland species to elevated CO₂ and drought. Plant Biol. 17, 298-310.

3.1. Introduction

It is anticipated that the concentration of CO₂ in the atmosphere will double by the end of the century compared to the values at the beginning of the century (*i.e.*, reaching 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ or higher (IPCC, 2007)). This rise along with the predicted increase in the duration and intensity of drought periods during the XXI century, which is associated with irregular precipitation and higher temperature (IPCC, 2007), could have different consequences for vegetation, varying from short-term physiological responses to long-term changes in the structure and function of ecosystems (Mooney et al., 1991; Curtis et al., 1995). Ultimately, these changes will affect the productivity of plant communities (Naudts et al., 2014).

Drought provokes changes in the aeration and hydraulic conductance of soil. In addition, soil water potential is more negative (Rozema, 1993), which complicates the uptake of water and mineral nutrients, affecting plant water relations (Robredo et al., 2007). To reduce water loss, plants close their stomata, reducing the availability of CO₂

in the chloroplast, yielding less photosynthesis (Chaves et al., 2003; Raven et al., 2004; Robredo et al., 2007). Stomatal closure is the major limiting factor for photosynthesis under drought conditions; however, when drought becomes more severe, effects on biochemical reactions and the use of light energy can occur (Flexas et al., 2002; Lawlor & Cornic, 2002; Peña-Rojas et al., 2004). The aforementioned alterations usually decrease productivity.

In contrast, the elevated CO₂ in well-watered conditions increases photosynthetic assimilation, despite stomatal closure, especially in C3 plants (Lawlor & Keys, 1993; Drake et al., 1997). Moreover, the increase in photosynthesis associated with the elevated CO₂ increases the availability of carbon skeletons to augment biomass (Kimball, 1983; Manning & Tiedemann, 1995; Champigny & Mousseau, 1999; Schapendonk et al., 2000).

When plants are subjected to drought under elevated CO₂, they lose water more slowly due to stomatal closure and display a lower transpiration rate compared to plants growing under ambient CO₂ (Bunce & Ziska, 1998; Robredo et al., 2007; Vu & Allen, 2009; Wall et al., 2011). It has also been suggested that elevated CO₂ could increase tolerance to drought, permitting plants to perform osmotic adjustment (Wullschleger et al., 2002). Due to the greater photosynthetic rates under elevated CO₂, several studies demonstrated that elevated CO₂ alleviated the loss of production caused by environmental stress (Pérez-López et al., 2013b).

Several studies analyzed the aforementioned responses of water relations and gas exchange to the interactive effect of elevated CO₂ and water stress on various species when grown alone or in monoculture. However, it is thought that the type of competition regulates the ecophysiological response to various abiotic stresses, altering the response that plants had when grown alone or in monoculture, increasing or decreasing plant growth (Thomas & Bazzaz, 1993; Wayne & Bazzaz, 1995; Körner, 1995; Lüscher et al., 1996; Warwick et al., 1998; Poorter & Navas, 2003; Verlinden et al., 2013). Nevertheless, few studies have examined the effect of elevated CO₂ in combination with water stress when plants are grown in mixture (Dijkstra et al., 2010). To our knowledge, no study has addressed the possible effect of plant water relations,

gas exchange and chlorophyll a fluorescence on the growth response of plants in monoculture and mixture to elevated CO₂ and drought in concert.

Indeed, in natural ecosystems, plants coexist with other plants from the same and different species. This coexistence implies competition for available resources, such as water, mineral nutrients, and light (Van der Werf et al., 1993; Warwick et al., 1998). In actual environmental conditions, each species grows depending on the resources available. If the environmental conditions change, the growth of the species may change as well, altering the distribution of species in the ecosystem. Grasslands are a major type of ecosystem, covering approximately 25% of the earth's surface (FAO, 2007). Despite the great importance of this ecosystem, few studies have focused on the influence of future climate conditions on grassland species ecophysiology when plants are grown in monoculture or mixture and how grassland will adapt to global change. This void in the field prompted us to propose the following objectives: (1) to study the effects of water stress and elevated CO₂ on plant water relations, gas exchange, chlorophyll a fluorescence and aboveground biomass of four grassland species; (2) to elucidate if there are differences between those species and functional groups in these responses; (3) to analyze whether the type of competition alters the response of the species; and (4) to investigate if future climate conditions alter the competitiveness between species and functional groups.

3.2. Results

3.2.1. Water relations

After 10 days of drought under ambient CO₂, the midday leaf water potential (Ψ_{wmd}) of *Agrostis capillaris* (Ac) reached -1.07 MPa in monoculture (Fig. 3.1A), while in mixture, the reduction was larger, reaching values of -1.42 MPa (Fig. 3.1B). Under elevated CO₂, in both types of competition, the decreases provoked by drought were similar to those recorded at ambient CO₂. The hydraulic conductance (HC) was 30% higher in mixture than in monoculture in well-watered conditions at ambient CO₂. Elevated CO₂ reduced HC by 23% and 47% in monoculture and mixture, respectively, in well-watered conditions (Fig. 3.1C-D). Drought decreased HC by 70% and 90%, regardless of the CO₂ concentration, in monoculture and mixture, respectively.

For *Festuca rubra* (Fr), when plants were deprived of water, at ambient CO₂ and in monoculture, the Ψ_{wmd} reached -1.47 MPa (Fig. 3.1A), whereas in mixture, the reduction was larger, reaching -1.68 MPa (Fig. 3.1B). Elevated CO₂ mitigated the drought effect in monoculture, but not significantly in mixture. Elevated CO₂ decreased HC by 61% and 27% in monoculture and mixture, respectively, in well-watered conditions (Fig. 3.1C,D). Under ambient CO₂, drought diminished HC by 64% and 85% in monoculture and mixture, respectively. At elevated CO₂ in monoculture, drought did not decrease HC, whereas in mixture, the drop-off was less marked than at ambient CO₂.

For *Trifolium pratense* (Tp) in monoculture at ambient CO₂, drought decreased Ψ_{wmd} , reaching values of -2.84MPa (Fig. 3.1A), while in mixture, the decrease was less marked, reaching only -2.25 MPa (Fig. 3.1B). Under combined conditions of drought and elevated CO₂, the decreases were less marked in both types of competition, reaching -2.13 MPa in monoculture and -1.32 MPa in mixture. In well-watered conditions at ambient CO₂, the HC was 20% lower in mixture than in monoculture (Fig. 3.1C,D). Elevated CO₂ reduced HC by 40% in monoculture, but not in mixture under

well-watered conditions. Drought diminished HC by approximately 90%, regardless the type of competition and CO₂ levels.

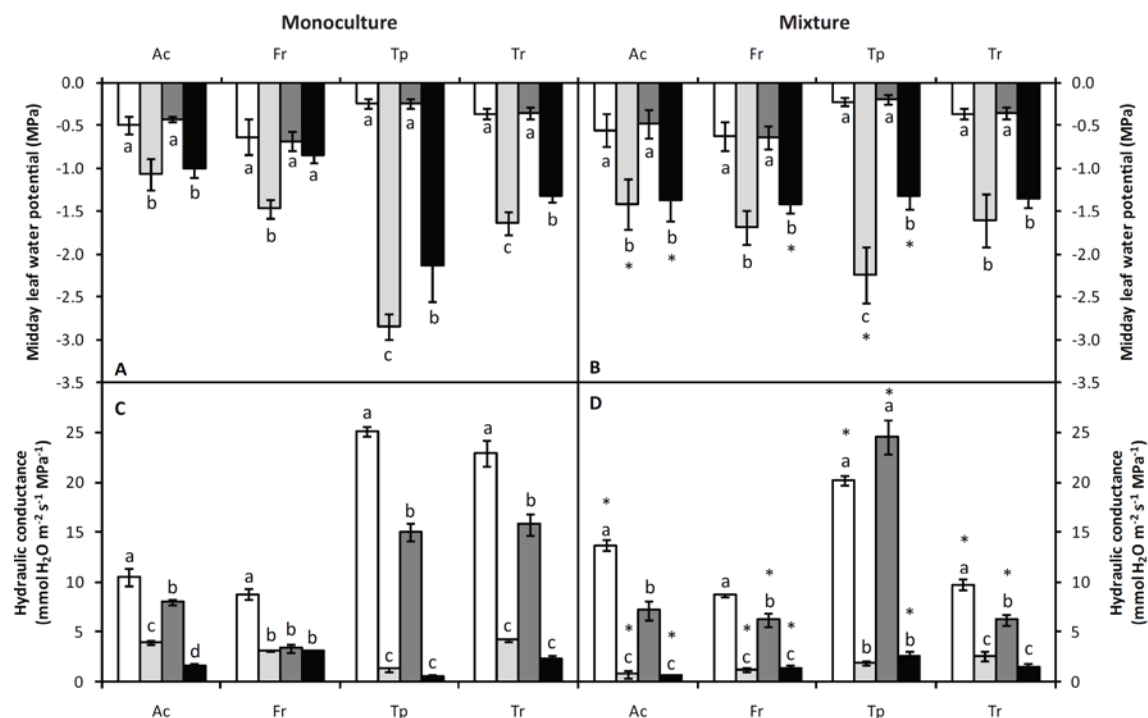


Fig. 3.1. Effects of drought and CO₂ on midday leaf water potential (Ψ_{wmd}) in monoculture (A) and mixture (B) and on hydraulic conductance (HC) in monoculture (C) and mixture (D). White bars represent well-watered plants at ambient CO₂, light gray bars represent drought plants at ambient CO₂, dark gray bars represent well-watered plants at elevated CO₂, and black bars represent drought plants at elevated CO₂. *Agrostis capillaris* (Ac), *Festuca rubra* (Fr), *Trifolium pratense* (Tp) and *Trifolium repens* (Tr). Each value represents the mean \pm SE of at least three independent experiments, each performed in triplicate. Different letters indicate significant differences within the same species and competition regime at $P \leq 0.05$. * indicates differences within the same species between monoculture and mixture.

Drought diminished the Ψ_{wmd} of *Trifolium repens* (Tr) under ambient CO₂, reaching values of approximately -1.6 MPa, regardless of the type of competition (Fig. 3.1A,B). In elevated CO₂, the decreases in Ψ_{wmd} provoked by drought were less marked and similar in both types of competition, resulting in values of approximately -1.35 MPa. HC was 57% lower in mixture than in monoculture under ambient CO₂ and well-watered conditions (Fig. 3.1C-D). In elevated CO₂, HC was approximately 30%

lower, regardless of competition in well-watered conditions. Drought decreased HC by approximately 80%, regardless the type of competition or CO₂ levels.

3.2.2. Gas exchange parameters

In well-watered conditions, elevated CO₂ increased the CO₂ assimilation rate (*A*) of Ac by 26% and 37% in monoculture and mixture, respectively (Fig. 3.2A-B). In monoculture, drought did not affect *A* under ambient or elevated CO₂, whereas in mixture, *A* decreased by 51% under ambient CO₂ and 14% under elevated CO₂. In well-watered conditions, elevated CO₂ diminished the stomatal conductance (*g_s*) and instantaneous transpiration rate (*E*) in monoculture by 55% and 43%, respectively, and in mixture by 43% and 32%, respectively (Fig. 3.2C-D,G-H). Drought decreased *g_s* and *E* by a similar extent only in mixture, approximately 80% and 70% at ambient and elevated CO₂, respectively. As expected, the intercellular CO₂ concentration (*C_i*) of Ac increased in response to elevated CO₂ by 70% on average in well-watered conditions under both types of competition (Fig. 3.2E-F). Drought only affected significantly *C_i* at elevated CO₂ in mixture. The instantaneous transpiration efficiency (*ITE*) in well-watered conditions was 123% and 102% higher under elevated CO₂ compared to ambient CO₂ in monoculture and mixture, respectively (Fig. 3.2I-J). Drought did not affect *ITE* in monoculture at any CO₂ concentration, while in mixture, it increased by 163% and 130% at ambient and elevated CO₂, respectively.

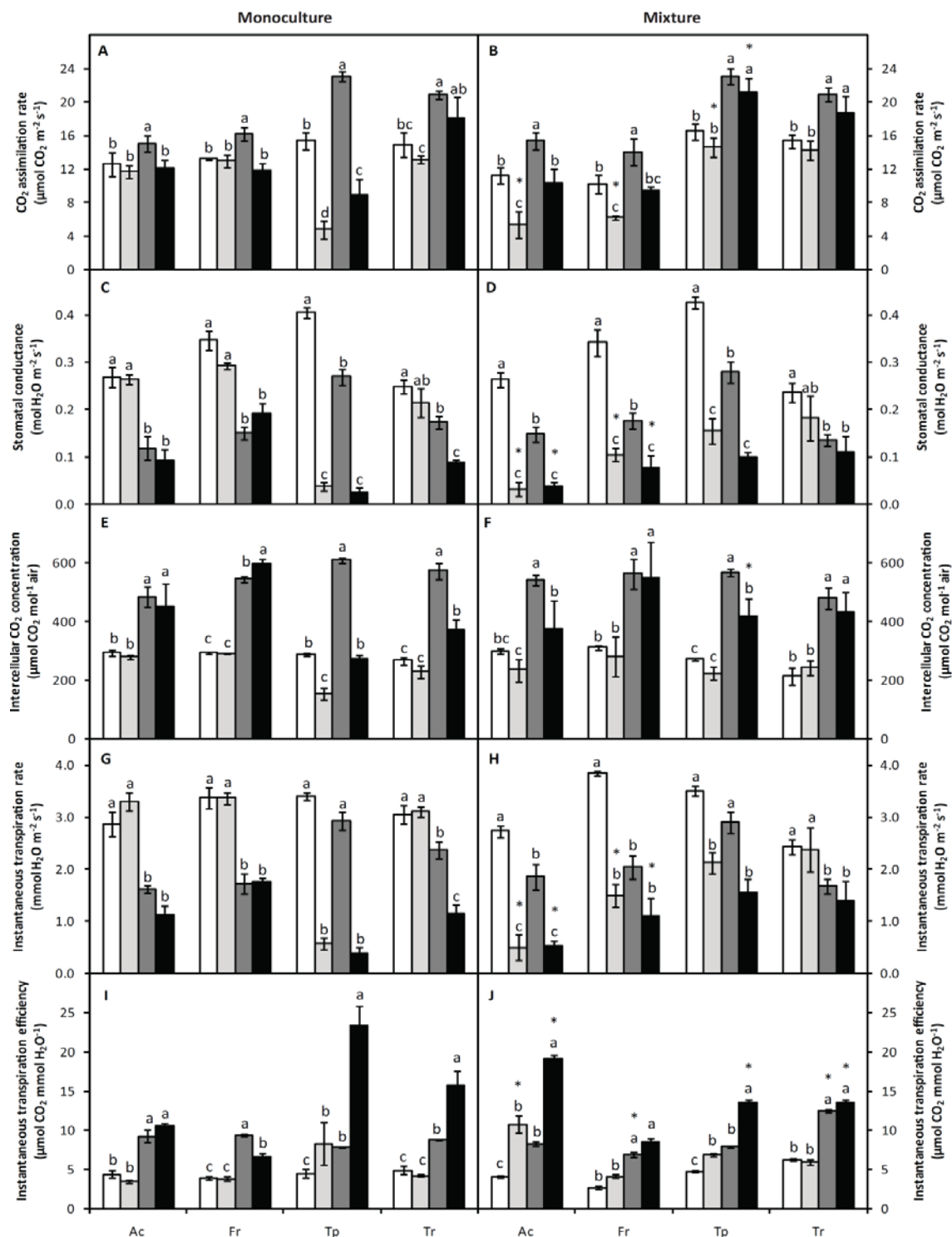


Fig. 3.2. Effects of drought and CO₂ on the CO₂ assimilation rate (A) in monoculture (A) and mixture (B), on stomatal conductance (g_s) in monoculture (C) and mixture (D), on intercellular CO₂ concentration (C_i) in monoculture (E) and mixture (F), on instantaneous transpiration rate (E) in monoculture (G) and mixture (H), and on instantaneous transpiration efficiency (ITE) in monoculture (I) and mixture (J). Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 3.1.

Four species

In well-watered conditions, Fr increased A by 22% and 37% under elevated CO_2 in monoculture and mixture, respectively (Fig. 3.2A-B). Drought did not provoke significant differences in monoculture, but it reduced A by 39% under ambient CO_2 in mixture. Under combined conditions of elevated CO_2 and drought, this decrease was less noticeable. Elevated CO_2 decreased g_s by approximately 50% in well-watered plants and 30% in drought plants, regardless of the type of competition (Fig. 3.2C-D). Drought decreased g_s in mixture by 69% at ambient CO_2 and 57% at elevated CO_2 . In well-watered conditions, C_i increased under elevated CO_2 by approximately 80%, regardless of the type of competition (Fig. 3.2E-F). Drought did not affect C_i , regardless of the CO_2 or competition conditions. Elevated CO_2 reduced E by approximately 45% compared to ambient CO_2 , regardless of the type of competition in well-watered conditions (Fig. 3.2G-H). Water stress only decreased E in mixture, and the decrease was only significant under ambient CO_2 . Elevated CO_2 increased ITE by 139% and 159% in monoculture and mixture, respectively, in well-watered conditions (Fig. 3.2I,J). Drought did not affect ITE in any CO_2 concentration or type of competition, except under elevated CO_2 and drought in monoculture. In T_p , elevated CO_2 in well-watered conditions increased A by approximately 35%, regardless of the type of competition (Fig. 3.2A-B). Drought decreased A in monoculture by 68% under ambient CO_2 and 56% under elevated CO_2 . In mixture, drought did not cause any significant differences, regardless of CO_2 concentration. In well-watered conditions, elevated CO_2 reduced g_s by nearly 30%, regardless of the type of competition (Fig. 3.2C-D). Drought decreased g_s by 90% in monoculture under both ambient and elevated CO_2 . In mixture, the decreases in response to drought were less marked, approximately 60%, regardless of the CO_2 concentration. In well-watered conditions, elevated CO_2 increased C_i by approximately 110%, regardless of the type of competition (Fig. 3.2E-F). In monoculture, drought diminished C_i by approximately 50%, regardless of CO_2 concentration. In mixture, drought only decreased C_i under elevated CO_2 . Elevated CO_2 affected E in well-watered conditions in both types of competition, but this effect was not significant (Fig. 3.2G-H). Drought reduced E by approximately 85% in monoculture under both CO_2 concentrations. In mixture, the decreases provoked by drought were less noticeable, approximately 40%, regardless of the CO_2 concentration. Elevated CO_2 increased ITE in well-watered conditions by 74% and 68% in monoculture and mixture,

respectively (Fig. 3.2I-J). Drought increased *ITE* to a greater extent in monoculture compared to mixture under both ambient and elevated CO₂.

In Tr, elevated CO₂ increased *A* by approximately 40%, regardless of the type of competition, in well-watered conditions (Fig. 3.2A-B). Drought did not significantly decrease *A* in either type of competition or CO₂ concentration. In well-watered conditions, elevated CO₂ reduced *gs* by approximately 40%, regardless of the type of competition (Fig. 3.2C-D). The effect of drought on *gs* was only significant in monoculture under elevated CO₂. At elevated CO₂, *Ci* increased by approximately 120%, regardless of the type of competition, in well-watered conditions (Fig. 3.2E-F). Drought only affected *Ci* in monoculture under elevated CO₂. *E* was 20% higher in monoculture than in mixture (Fig. 3.2G-H). The elevated CO₂ diminished *E* by approximately 30% in well-watered conditions, regardless of the type of competition; *E* was reduced by 60% and 40% in monoculture and in mixture, respectively, under drought conditions. Drought only affected *E* in monoculture under elevated CO₂. Elevated CO₂ increased *ITE* by approximately 90% in any type of competition (Fig. 3.2I-J). Drought did not affect *ITE* under ambient CO₂. However, when plants were grown under elevated CO₂, the water stress increased the effect of elevated CO₂ in monoculture, but not in mixture.

3.2.3. Chlorophyll *a* fluorescence

There were no significant differences in *Ac* between treatments regarding the maximal efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m) in monoculture (Fig. 3.3A). In mixture, drought reduced F_v/F_m , regardless of CO₂ concentration (Fig. 3.3B). In monoculture and well-watered conditions, comparing elevated CO₂ to ambient CO₂, the actual quantum yield of PSII (Φ_{PSII}), the photochemical efficiency of PSII open centers (F_v'/F_m') and the photochemical quenching (qP) increased by 32%, 15%, and 16%, respectively (Fig. 3.3C,E,G), whereas the non-photochemical quenching (NPQ) was 35% lower (Fig. 4I). However, in mixture under actinic illumination, elevated CO₂

Four species

did not affect any chlorophyll fluorescence parameter (Φ_{PSII} , F_v/F_m' , qP , NPQ) (Fig. 3.3D,F,H,J). These parameters were also not affected by drought in any type of competition or CO_2 levels except for qP , which decreased by 10% at elevated CO_2 in monoculture.

In Fr, no significant differences between treatments were observed in any of the fluorescence parameters analyzed in monoculture (Fig. 3.3A,C,E,G,I), although Φ_{PSII} and qP increased by 16% and 10%, respectively, compared to mixture. In mixture, F_v/F_m remained unchanged between treatments (Fig. 3.3B). Elevated CO_2 did not affect Φ_{PSII} and qP (Fig. 3.3D,H). F_v/F_m' was 13% higher at elevated CO_2 compared to ambient CO_2 in both well-watered and drought conditions (Fig. 3.3F). NPQ diminished by 35% under elevated CO_2 in well-watered conditions (Fig. 3.3J). Drought decreased Φ_{PSII} by 20% in mixture only at ambient CO_2 , but F_v/F_m' , qP , and NPQ were not affected by drought, regardless of the CO_2 level.

For Tp, no significant differences in F_v/F_m were observed between treatments (Fig. 3.3A-B). In well-watered plants in monoculture, elevated CO_2 increased Φ_{PSII} and qP by 33% and 18%, respectively, while in mixture, they increased by 13% and 10%, respectively; F_v/F_m' was not change by elevated CO_2 in any type of competition (Fig. 3.3C-H). At ambient CO_2 , drought decreased Φ_{PSII} , F_v/F_m' , qP in monoculture by 52%, 31%, and 22%, respectively, but these parameters were not altered in mixture. In monoculture, under combined conditions of elevated CO_2 and drought, the elevated CO_2 mitigated the drought-induced reduction. Elevated CO_2 did not affect NPQ in well-watered conditions (Fig. 3.3I-J). Under ambient CO_2 , drought increased NPQ by 280% and 50% in monoculture and mixture, respectively. Elevated CO_2 mitigated the drought-induced increases by 31% and 42% in monoculture and mixture, respectively.

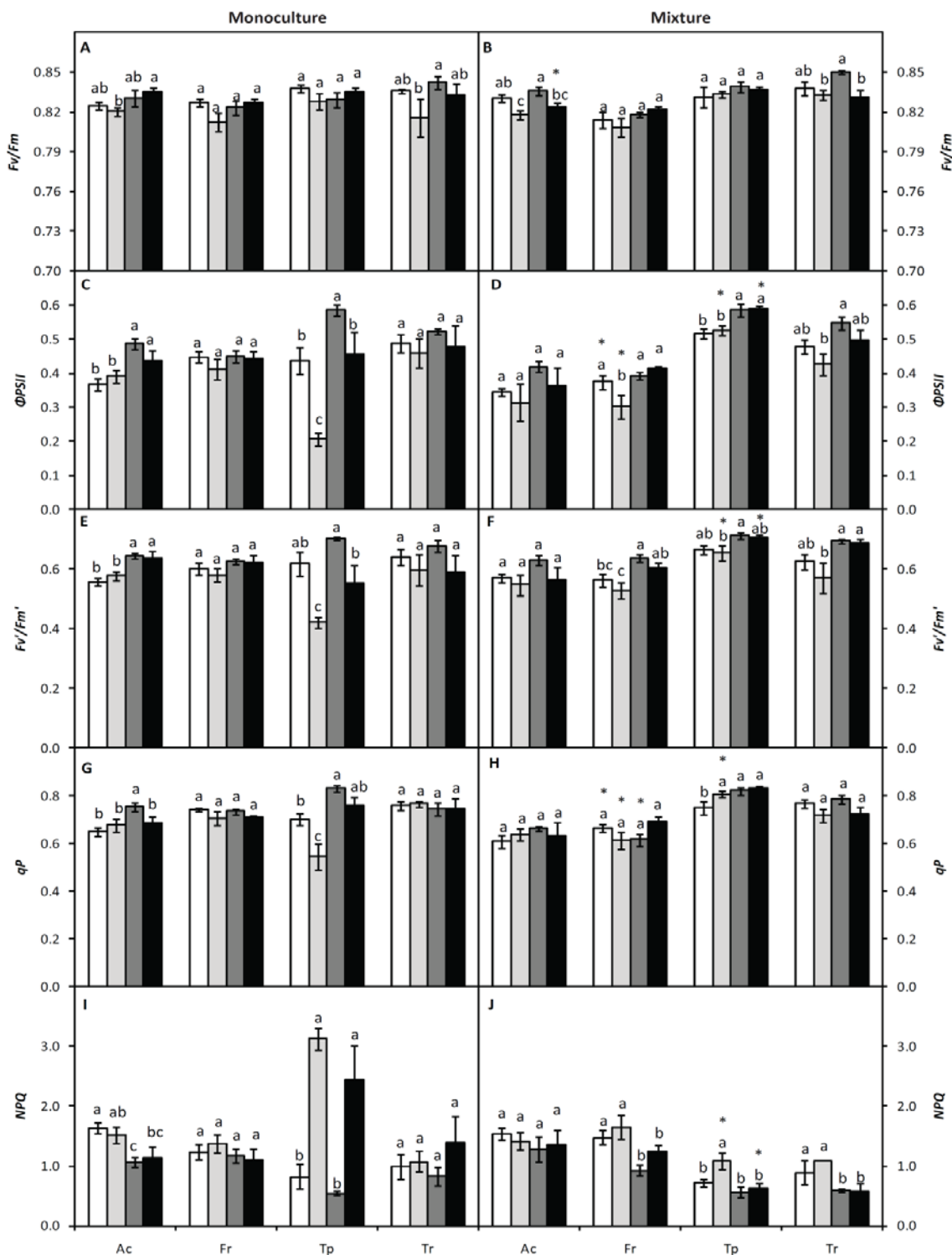


Fig. 3.3. Effects of drought and CO_2 on maximal efficiency of PSII photochemistry (F_v/F_m) in monoculture (A) and mixture (B), actual quantum yield of PSII (Φ_{PSII}) in monoculture (C) and mixture (D), photochemical efficiency of PSII open centers (F_v/F_m') in monoculture (E) and mixture (F), photochemical quenching (qP) in monoculture (G) and mixture (H), and non-photochemical quenching (NPQ) in monoculture (I) and mixture (J). Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 3.1.

Four species

No significant differences in Tr were observed between treatments in any of the fluorescence parameters analyzed (Fig. 3.3), except in the *NPQ*, where elevated CO₂ decreased *NPQ* by approximately 40% in mixture, regardless of water treatment (Fig. 4J).

3.2.4. Aboveground biomass

The legumes presented higher aboveground biomass than the grasses in all treatments, especially when grown in mixture (Fig. 3.4).

The aboveground biomass of Ac in monoculture under ambient CO₂ and well-watered conditions was 0.27 g DW plant⁻¹ (Fig. 3.4A) and 0.18 g DW plant⁻¹ in mixture (*i.e.*, 34% lower) (Fig. 3.4B). Elevated CO₂ increased the aboveground biomass by 44% and 28% in monoculture and mixture, respectively, in well-watered plants. Drought did not significantly affect the aboveground biomass in any type of competition under either CO₂ level.

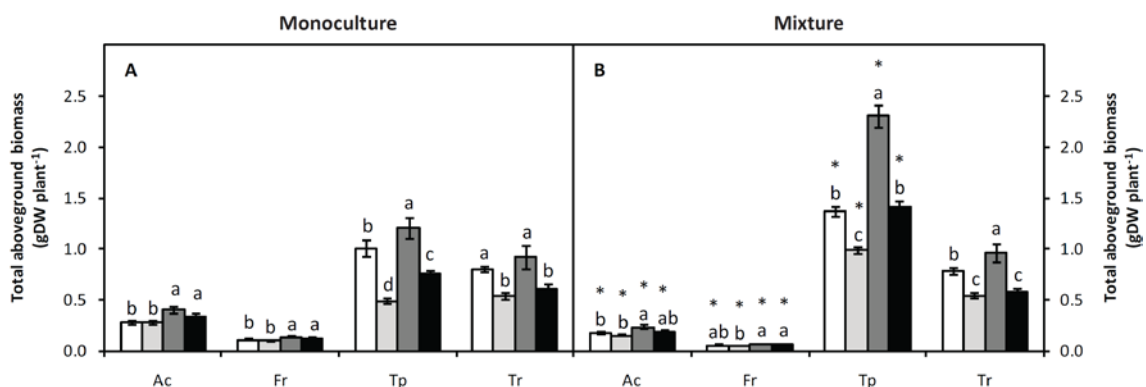


Fig. 3.4. Effects of drought and CO₂ on total aboveground biomass in monoculture (A) and in mixture (B). Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 3.1.

For Fr under ambient CO₂ and well-watered conditions, the aboveground biomass was 0.11 g DW plant⁻¹ in monoculture (Fig. 3.4A) and 46% lower in mixture (*i.e.*, 0.06 g DW plant⁻¹) (Fig. 3.4B). In well-watered conditions, elevated CO₂ increased the aboveground biomass by 24% and 15% in monoculture and mixture, respectively. Drought did not affect the aboveground biomass, regardless of the type of competition or CO₂ conditions.

For Tp under ambient CO₂ and well-watered conditions, the aboveground biomass was 1.00 g DW plant⁻¹ in monoculture (Fig. 3.4A) and 1.37 g DW plant⁻¹ in mixture (*i.e.*, 37% higher) (Fig. 3.4B). Elevated CO₂ increased the aboveground biomass by 19% and 67% in monoculture and mixture, respectively, in well-watered conditions. Under ambient CO₂, drought decreased the aboveground biomass by 51% and 27% in monoculture and mixture, respectively. When Tp was subjected to combined conditions of elevated CO₂ and drought, the decreases were less marked in monoculture.

Tr showed the same aboveground biomass under ambient CO₂ and well-watered conditions in both types of competition, approximately 0.80 g DW plant⁻¹ (Fig. 3.4). In well-watered plants, elevated CO₂ increased the aboveground biomass by 14% (not significant) and 22% in monoculture and mixture, respectively. Under ambient CO₂, drought decreased the aboveground biomass by 32% and 30% in monoculture and mixture, respectively. Elevated CO₂ did not reverse the effect of drought.

Productivity was lower in grasses than in legumes (Table 3.1), yielding 1.5 t ha⁻¹ in Ac, 0.6 t ha⁻¹ in Fr, 5.3 t ha⁻¹ in Tp, and 4.2 t ha⁻¹ in Tr, in well-watered conditions at ambient CO₂. In mixture, the productivity was 3.1 t ha⁻¹. The monoculture of Tp displayed higher productivity values, except when plants were subjected to drought under ambient CO₂ conditions, where the monoculture of Tr achieved a higher productivity. Elevated CO₂ increased the productivity of all treatments. Drought decreased the productivity of the monocultures of Tp and Tr and the mixture at all CO₂ concentrations.

Four species

Table 3.1. Effects of drought and CO₂ on aboveground productivity (t ha⁻¹). Values represent the means ± SE of at least three independent experiments, each performed in triplicate. Different letters along the same row indicate significant differences ($P \leq 0.05$).

| CO ₂ levels | Ambient CO ₂ | | Elevated CO ₂ | |
|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | Well-watered | Drought | Well-watered | Drought |
| Monoculture of <i>A. capillaris</i> | 1.46 ± 0.09 ^b | 1.46 ± 0.08 ^b | 2.10 ± 0.16 ^a | 1.81 ± 0.13 ^a |
| Monoculture of <i>F. rubra</i> | 0.59 ± 0.03 ^b | 0.54 ± 0.03 ^b | 0.73 ± 0.04 ^a | 0.65 ± 0.04 ^{ab} |
| Monoculture of <i>T. pratense</i> | 5.26 ± 0.45 ^b | 2.56 ± 0.13 ^d | 6.30 ± 0.54 ^a | 3.96 ± 0.21 ^c |
| Monoculture of <i>T. repens</i> | 4.21 ± 0.16 ^a | 2.83 ± 0.16 ^b | 4.80 ± 0.59 ^a | 3.19 ± 0.24 ^b |
| Mixture | 3.13 ± 0.13 ^b | 2.31 ± 0.09 ^c | 4.66 ± 0.28 ^a | 2.83 ± 0.15 ^b |

Despite the dominance of Tp in mixed culture, the relative proportion of each species to the productivity changed depending on water regime and CO₂ concentration (Fig. 3.5). Hence, the proportion of contribution (%) of each species differed due to environmental conditions. In well-watered plants, increased CO₂ concentration in the atmosphere enhanced the proportion of Tp and reduced the proportion of Tr, Ac, and Fr (Fig. 3.5C). In response to water deficiency, elevated CO₂ increased the contribution of Tp to the productivity and reduced the contribution of Tr, while the percentage of contribution of Ac and Fr did not change. In contrast, the effect of water availability on the contribution of each species to the productivity in mixture was different depending on the environmental CO₂ concentration. At ambient CO₂, the contribution percentage of Ac and Fr increased in response to water shortage, whereas the contribution of Tp diminished, and the contribution of Tr did not change (Fig. 3.5B). Under elevated CO₂, drought increased the contribution of Ac and Fr and reduced the contribution of Tr; the Tp contribution was maintained almost constant (Fig. 3.5D).

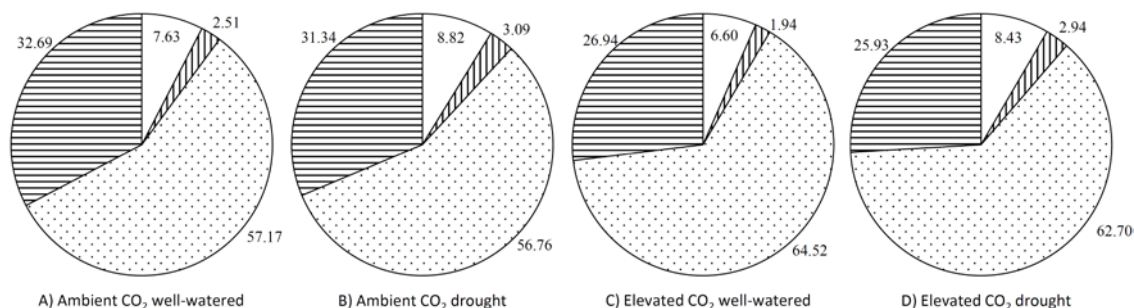


Fig. 3.5. Contribution (%) of each species to the mixture in A) ambient CO₂ and well-watered conditions, B) ambient CO₂ and drought conditions, C) elevated CO₂ and well-watered conditions, and D) elevated CO₂ and drought conditions. White (*Agrostis capillaris*), vertical stripes (*Festuca rubra*), dotted (*Trifolium pratense*), and horizontal stripes (*Trifolium repens*). Growth conditions, as depicted in Fig. 3.1.

In the grasses, the relative competition intensity (RCI) was positive in all the treatments, indicating competition (*i.e.*, the grasses grew more in monoculture than in mixture) (Fig. 3.6). For Tp, the RCI was negative for all the treatments, indicating facilitation (*i.e.*, the plants grew more in mixture than in monoculture). The RCI in Tr was nearly zero at all treatments, indicating that the aboveground biomass in monoculture was similar to that in mixture.

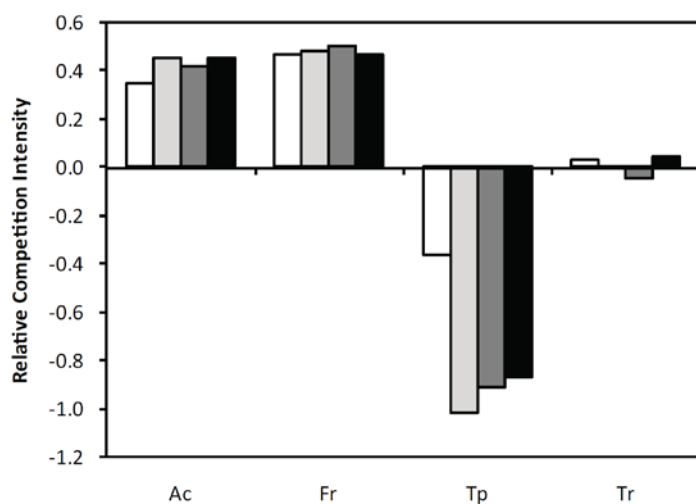


Fig. 3.6. Effects of drought and CO₂ on relative competition intensity (RCI). Growth conditions as depicted in Fig. 3.1.

Four species

Elevated CO₂ in well-watered conditions increased the RCI for grasses, while it produced more negative values for legumes (Fig. 3.6). Drought at ambient CO₂ provoked the same pattern in RCI for grasses and legumes compared to the value in elevated CO₂ (*i.e.*, more positive values for grasses and more negative for legumes comparing to well-watered conditions and ambient CO₂). When plants were subjected to elevated CO₂ and drought, the RCI values of grasses did not change, but Tp presented less negative values and Tr showed slightly positive values.

3.3. Discussion

3.3.1. Effects of elevated CO₂ under non-stress conditions

Under non-stress conditions, CO₂ levels did not affect the plant water potential of any species, regardless of the type of competition (Fig. 3.1A-B), our group obtained similar results in barley (Pérez-López et al., 2010a). However, the response of Ψ_{wmd} to elevated CO₂ in well-watered plants is unclear, as higher (Tognetti et al., 2000), unaffected (Tognetti et al., 1998; Ferris & Taylor, 1994; 1995), and lower (Centritto et al., 1999a; De Luis et al., 1999) water potentials have all been reported. Previous reports demonstrated that g_s was reduced by an average of 22% under elevated CO₂ concentrations (Ainsworth & Long, 2005). However, in our study, the decrease in g_s was higher: 30-40% in legumes and 50% on average in grasses, in both types of competition (Fig. 3.2C-D). Stomatal closure in all four species permitted to diminish E , as was reported for numerous species (Robredo et al., 2007; 2010; Jiang et al., 2012; Pérez-López et al., 2012; Pérez-López et al., 2013b). Despite stomatal closure, C_i was higher under elevated CO₂ than at ambient CO₂ due to the higher external CO₂ concentration, which increased A for all the species in this study (Fig. 3.2A-B); other authors reported similar results for grassland species (Lee et al., 2011; Naudts et al., 2013). The higher A and lower E increased ITE , indicating that plants under elevated CO₂ are more efficient in terms of water use. The increases in photosynthetic rates due to elevated CO₂ permitted a higher availability of carbon skeletons to produce greater biomass (Sæbø & Mortensen, 1995; Nowak et al., 2004a; Ainsworth & Long, 2005; Pérez-López et al., 2013a). The aboveground biomass increased between 1.1 and 1.67 times that obtained at ambient CO₂ (Fig. 3.4); these results are in concordance with the ones most frequent recollected by Poorter & Navas (2003) for 350 species.

Moreover, the growth response of plants to elevated CO₂ can significantly change (often reduced but also enhanced) when grown in competing populations with plants of different species compared to when growing with plants of the same species or in the absence of neighbors (Owensby et al., 1993; Wayne & Bazzaz, 1995; Goverde et al., 2002). In our study, elevated CO₂ enhanced the growth of grasses more in monoculture

than in mixture, while legumes' growth was more enhanced when grown in mixture (Fig. 3.4). The different response of a species to increased CO₂ (*i.e.*, growth enhancement or reduction) when grown in interspecific competition depends on an adequate supply of resources, such as water, light, and mineral nutrients. In mixture, legumes displayed higher *A*, which leads to higher carbohydrates production and higher HC, which can allow these plants to acquire more water and mineral nutrients from the soil than grasses, and increasing their productivity (Bernston et al., 1998; Maestre et al., 2005).

3.3.2. Drought effects at ambient CO₂

Similar to reports from other authors, in monoculture, drought had different implications for the diverse species analyzed (Dijkstra et al., 2010; Suriyagoda et al., 2011).

In grasses, the Ψ_{wmd} reached values of -1.07 MPa for *Ac* and -1.47 MPa for *Fr*. However, these decreases were not sufficient to alter plant growth, as *gs*, $\Phi PSII$, *A* and aboveground biomass remained constant. Drought did not affect these parameters, despite the fact that it markedly reduced water potential. Thus, these grass species might require a threshold level of more negative values of Ψ_{wmd} to alter photosynthetic processes, and this threshold differs among species (Polley et al., 2012).

In *Tr*, Ψ_{wmd} was reduced to -1.6 MPa. Despite the fact that the drop-off of Ψ_{wmd} was higher than in grasses, drought did not diminish *A*. Nevertheless, the aboveground biomass was reduced. This finding indicates that the carbon allocation pattern changed, directing the photoassimilates to roots and other processes. In general, plants respond to a relative shortage of any essential resource by increasing allocation to the structures and functions responsible for the acquisition of that limiting resource (Bloom et al., 1985; Coleman et al., 1989), in this case the roots for water and mineral nutrient uptake. Although we did not detect changes in *A*, Jiang et al. (2010) observed that when *Tr* was

under more severe drought conditions, where Ψ_{wmd} reached values of approximately -2 MPa, gas-exchange and photochemical parameters decreased. Thus, in our study, Tr did not reach its threshold level to translate the effect of drought into alterations in photosynthetic processes.

The highest decrease in Ψ_{wmd} of all the species was recorded in Tp, reaching -2.8 MPa. In parallel, g_s decreased, which provoked a smaller C_i , and consequently, A was reduced notably. According to Flexas et al. (2004), when g_s decreased by more than 60%, drought is considered severe, which is similar to our observation for Tp; in such conditions, other limitations to photosynthesis could appear. F_v/F_m did not differ between drought treatments and controls, indicating that the photosynthetic electron transport machinery was intact; other authors reported similar findings (Robredo et al., 2010; Signarbieux & Feller, 2011). However, Φ_{PSII} was reduced by water stress. Water deficit produced the greatest effect on F_v'/F_m' , reducing energy transduction from the antennae to the reaction centers during illumination to prevent energy surplus. At the same time, NPQ increased, which allowed the plant to dissipate the excess radiant energy not consumed by photosynthesis and to be wasted as heat in the PSII antennae complex (Robredo et al., 2010). Thus, the reduction of light energy channeled to the reaction centers implies a reduction in the quantity of energy transferred to photochemical reactions (qP). Therefore, as reported by others, under ambient CO_2 and water deficit, there were stomatal and photochemical limitations to A , decreasing aboveground biomass, as other authors stated in grassland species under drought conditions (Naudts et al., 2011). However, other limitations, such as decreases in mesophyll conductance, could not be discounted. The decrease in E was higher than that of A ; thus, ITE increased with drought (Robredo et al., 2007), indicating that Tp uses water more efficiently under drought conditions.

In mixture, the decrease in Ψ_{wmd} was different than in monoculture, changing the response of plants depending on the species analyzed; Suriyagoda et al. (2011) reported similar results in legumes and grasses. This could be explained by the fact that in mixture, the HC of legumes was higher than that of grasses, allowing the formers to uptake more water in mixture than the grasses. Smith & Roberts (2003) suggested that

Four species

when the root systems of two or more species occupy the same soil volume, water is partitioned in proportion to the relative ability of each species to uptake water.

In grasses, Ψ_{wmd} was reduced to a greater extent in mixture than in monoculture, -1.42 MPa in Ac and -1.68 MPa in Fr. To diminish E and water loss, the grasses closed their stomata. However, this stomatal closure did not decrease C_i , possibly due to reduced Rubisco activity, diminishing the consumption of CO_2 , and consequently, CO_2 was not reduced, representing a possible biochemical limitation. For Ac, photochemical limitations were not detected, as demonstrated by the constancy of the fluorescence parameters analyzed. Nevertheless, in Fr, photochemical limitations were observed, as demonstrated by the decrease in Φ_{PSII} . Therefore, the reduction in A was due to stomatal and feasible biochemical limitations in Ac, as well as stomatal, photochemical, and possibly biochemical limitations in Fr. However, reductions in A in response to a decrease in mesophyll conductance could not be discarded. Nevertheless, these decreases in A did not correlate with a significant reduction in aboveground biomass, possibly because the effects on biomass were in the belowground part, which we did not measure. This finding could be caused by a shift in the direction of the photoassimilates to the acquisition of the most limiting resource, in this case, the light for the grasses in the mixture culture. In short, plants would invest proportionally more to the aboveground biomass than the belowground biomass. Hardacre et al. (1986) also observe this response in grass species in competition with legumes in a mixture of *Lolium perenne* and *Trifolium repens*.

The decrease in Ψ_{wmd} of Tr was similar in mixture and monoculture. The response of the gas exchange parameters was similar, and A did not decrease. However, the aboveground biomass diminished, raising the same reasoning as in monoculture (*i.e.*, a change in the carbon allocation pattern occurred, directing the photoassimilates to the structures and functions responsible for the acquisition of the limiting resource, in this case, water availability).

The only species that showed a less negative value of Ψ_{wmd} in mixture was Tp, reaching -2.2 MPa in mixture, and -2.8 MPa in monoculture. This improved water status resulted in a less marked stomatal closure, which permitted the plant to maintain A

similar values to those of well-watered plants. As aforementioned for Tr in monoculture and mixture, the aboveground biomass decreased despite a similar A , possibly due to a change in the carbon allocation pattern, directing the photoassimilates to the structures and functions responsible for the acquisition of water, such as roots, changing the ratio between source and sink organs.

The different response of the diverse species to drought indicates that some species are more adaptable to water deficit than others (Signarbieux & Feller, 2011). In our study, in spite of higher reduction in Ψ_{wmd} , the legumes, especially Tp, maintained higher A values than the grasses, with higher aboveground biomass production.

3.3.3. Drought effects at elevated CO₂

Under the combined conditions of drought and elevated CO₂, the decreases in Ψ_{wmd} were less marked; therefore, the negative impact of water deficit could be smaller. Other authors also observed this result (Polley et al., 2002; Robredo et al., 2007).

In monoculture, grasses in drought displayed decreased A compared to plants grown under elevated CO₂ and well-watered conditions. Grasses did not show decreases in g_s , and the fact that C_i was kept constant compared to well-watered plants at elevated CO₂ may indicate that other factors are limiting A under drought. In Ac, a decrease in qP was observed, suggesting that photochemical limitation on A was being recorded. In Fr, qP did not decrease, indicating that the photochemical processes were not one of the other factors limiting A . Nevertheless, it is possible that in both species, the mesophyll conductance could be affected by drought (Flexas et al., 2004). Despite the slight decrease in A , the aboveground biomass was not affected.

In Tr, a similar response to drought detected under ambient CO₂ was observed under elevated CO₂. Photosynthesis did not decrease, despite the fact that stomatal closure was observed and the C_i was reduced. This finding indicates that the light

energy supply ($400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at which A was measured (the same used at growth) was not sufficient to regenerate ribulose-1,5-bisphosphate to permit the plant to fix all the CO_2 available (Rasineni et al., 2011). Therefore, no differences in A were recorded between well-watered and drought plants. Despite the lack of decrease in A , the higher stomatal closure in drought than in well-watered conditions implied a reduction in water loss through transpiration; thus, the plants increased their ITE , indicating that plants under elevated CO_2 and drought are more efficient than under elevated CO_2 and well-watered conditions. Despite displaying a higher A value under elevated CO_2 compared to ambient CO_2 , the aboveground biomass was not increased. This result could be due to the different use of the photoassimilates for non-growth processes, such as mineral nutrients uptake (Pérez-López et al., 2014), osmotic adjustment (Wullschleger et al., 2002), and antioxidant metabolism (Pérez-López et al., 2010b).

In the case of T_p , a similar reduction in g_s was observed under elevated CO_2 and ambient CO_2 ; however, due to the higher external CO_2 concentration, C_i was higher. Higher CO_2 availability with a lower decrease in the energy transferred to photochemical reactions (Φ_{PSII}) permitted a superior A compared to that obtained at ambient CO_2 ; Robredo et al., (2010) obtained similar results in barley. Due to the constancy of the transpiration and the abovementioned increase in A , ITE was considerably higher, indicating that T_p under drought at elevated CO_2 uses water more efficiently than at ambient CO_2 . The increase in the photosynthetic rate under drought conditions due to elevated CO_2 permitted higher availability of carbon skeletons to produce greater biomass (Fig. 3.4).

When plants were grown under elevated CO_2 , the response to drought in mixture was different than in monoculture; Dijkstra et al. (2010) reported similar findings in grasses and legumes. In the grasses, drought under elevated CO_2 provoked less stomatal closure than at ambient CO_2 . In spite of the lower decrease in g_s , the absolute values were similar between CO_2 concentrations in drought. Nevertheless, due to the higher external CO_2 concentration, the C_i was superior to that observed at ambient CO_2 , reducing the diffusional effect of drought on A . In addition, in A_c , the elevated CO_2 could mitigate the negative effects of drought on a hypothetical biochemical limitation reported in drought at ambient CO_2 . In Fr , elevated CO_2 reversed the effects of drought

on photochemical limitation, but not on the likely biochemical limitation observed in drought at ambient CO₂. This reduction in the limitation of photosynthesis permitted the plants to achieve higher *A* and enhance the aboveground biomass compared to the effect of drought at ambient CO₂ (Fig. 3.4).

The behavior of legumes under combined conditions of elevated CO₂ and drought was species-dependent; thus, whereas *Tr* displayed no differences in *g_s* or *A* between the competition types, higher *g_s* and *A* were observed in mixture for *Tp*. As mentioned above, the higher external CO₂ concentration allows more CO₂ to enter to the chloroplast, yielding a higher *A* than at ambient CO₂ in drought conditions. The increase in *A*, with the same value of *E*, translated into a superior *ITE*, indicating that legumes in mixture use water more efficiently under elevated CO₂ and drought conditions than under elevated CO₂ and well-watered conditions. In the case of *Tp*, the higher *A* at elevated CO₂ than at ambient CO₂ produced a similar level of aboveground biomass compared to well-watered conditions at ambient CO₂.

3.3.4. Effects on productivity and competitiveness

Overall, the total primary production of the mixed community was intermediate between the production of the grass and legume communities, regardless of the water regime and CO₂ conditions. In all the treatments, except under ambient CO₂ and drought conditions, the type of culture that displayed the highest productivity was the monoculture of *Tp*, followed by the monoculture of *Tr*, the mixture, the monoculture of *Ac*, and the monoculture of *Fr* (Table 3.1).

CO₂ enrichment usually altered the contribution of plant species to biomass production in the grasslands (Teyssonneyre et al., 2002; Polley et al., 2003), favoring legumes over grasses (Niklaus et al., 2001; Teyssonneyre et al., 2002). On the other hand, CO₂ enrichment usually increased the production of one or more species without affecting the biomass of other species (Morgan et al., 2004); however, occasionally,

CO₂ enrichment caused a strong opposite response among species or functional groups (Polley et al., 2003; 2012). In our study, under elevated CO₂ concentrations and well-watered conditions, aboveground productivity increased; however, the response varied between species, as described by Bernston et al. (1998). Thus, all the type of cultures, except the monoculture of Tr, for which the increase was not significant, displayed more growth under elevated CO₂ than under ambient CO₂ in monoculture. In the mixture, the contribution of each species changed, increasing the contribution of Tp and decreasing the contribution of the others; several authors have also reported that increased CO₂ altered the contribution of different species to the mixture (Overdieck, 1986; Hardacre et al., 1986).

Drought decreased the productivity in any CO₂ concentration. In parallel, the contribution of grasses to the mixture productivity increased under drought conditions. Several authors have suggested that the presence of coexisting species may modify or amplify the environmental responses of species (Dunnett & Grime, 1999; Sala et al., 2000) due to differences in their physiological and morphological traits, leading to different abilities to maintain performance in competition (Grenier La Peyre et al., 2001). Moreover, when plants were subjected to drought and elevated CO₂ simultaneously, the aforementioned higher *A* observed in those conditions permitted higher productivity than in drought under ambient CO₂ (Centritto et al., 2002). Accordingly, our results show that interspecific competition is influenced by biological and physiological variables of the plants that are concurrent in a community and that the effect of multiple environmental changes may be synergic or antagonistic.

Navas et al. (1999) suggested that the presence of a specific neighbor might be sufficient to increase or debilitate the competitiveness of a species or functional group. In well-watered conditions under ambient CO₂, the RCI parameter of the grasses indicated that the mixture supposed a competition, (*i.e.*, a decrease in their growth), while for Tp was facilitation (*i.e.*, an increase in its growth). In Tr, the RCI was nearly zero, as the aboveground biomass remained similar between both competition types in this species. Zhang et al. (2008) obtained similar results in the growth of *Festuca rubra* and *Trifolium pratense*, observing competition for *Festuca rubra* and facilitation for *Trifolium pratense*.

In all cases, CO₂ concentration affected the competitive interaction between species; Carter & Peterson (1983) observed a similar effect. At elevated CO₂ in well-watered conditions, the RCI values observed at ambient CO₂ were accentuated; thus, the grasses suffered higher competition, while the legumes experienced higher facilitation.

In drought conditions at ambient CO₂, the biomass of the legumes decreased in monoculture and in mixture, and more so in monoculture. Therefore, in drought, the legumes experienced higher facilitation than in well-watered conditions, while the grasses, due to their higher decrease in growth in mixture than in monoculture, suffered higher competition. Other authors have also reported this species-specific response and shift in competitiveness along the environmental gradient (Reekie & Bazzaz, 1989; Richardson et al., 2002) because species differ in their optimal growth environments and their tolerance to abiotic stress (Hartley & Mitchell, 2005).

Under combined conditions of elevated CO₂ and drought, the aboveground biomass was higher than at ambient CO₂ under drought conditions. In these growth conditions, Tp was the only species which was favored, while the others suffered competition. The competition intensity for the grasses increased with decreased productivity, whereas the opposite was true for Tp.

Thus, we conclude that elevated CO₂ in well-watered conditions increased the aboveground biomass by augmenting *A*. Drought diminished the biomass reducing *A*, mainly due to stomatal limitations, and when drought was more severe, non-stomatal limitations also played a role. When plants were grown under combined conditions of elevated CO₂ and drought, the limitations observed under ambient CO₂ were reduced, permitting higher *A* and reducing the observed decrease in the aboveground biomass. The response to climate change was species-specific and dependent on the type of competition. Thus, the response of grasses to elevated CO₂ in well-watered conditions was higher in monoculture than in mixture, while it was higher in mixture than in monoculture for legumes. In contrast, the legumes were more affected than the grasses by drought in monoculture, while in mixture, the negative effect of drought was higher in grasses than in legumes due to their lower capacity to acquire water and mineral

Four species

nutrients. These differences in species-level growth in response to CO₂ and drought may lead to changes in the composition and biodiversity of the grassland plant community in response to future climate conditions.

4. Water relations

4.1. Introduction

Water is the main component of plants and constitute up to 70-80% of the weight of the plant (Sanchez-Diaz & Aguirreolea, 2000). Water has several functions in plants. On one hand, in the cells, the water acts as a solvent, allowing the movement of molecules between and within cells, and is the medium where most cellular biochemical reactions occur. On the other hand, water together with the cell wall allows plants to create a high internal hydrostatic pressure (turgor pressure). This turgor pressure is essential to many physiological processes, including cell elongation, gas exchange, phloem transport and several transport processes through membranes, and contributes to the rigidity of the tissues not lignified.

Water is continuously absorbed by the roots, transported through the plant and lost to the atmosphere; about 500 grams of water circulate through the plant per gram of organic matter generated by the plant. To carry out photosynthesis, plants must uptake carbon dioxide from the atmosphere, but in doing so it is exposed to water loss through stomata, through a process called transpiration. Additionally, during the flow of water to the atmosphere, the water acts as a heat sink, allowing the plant to achieve a reduction in leaf temperature, thereby reducing the heat effect caused by solar radiation (Taiz & Zeiger, 2010).

Water is the most limiting resource for plant production. Drought alters aeration and hydraulic conductance of the soil, causing a decrease in soil water potential (Rozema, 1993), which complicates water uptake. Therefore, plants must be able to adapt or tolerate drought as a mechanism to sustain its development and productivity. Drought tolerance is a complex trait involving multiple adaptations. The key to this is that the plant has the ability to maintain water uptake in increasingly dryer soil while minimizing water loss through the leaves.

To achieve this, plants conducted morphological adaptations such as the development of more numerous or longer roots or alterations in leaf morphology, reducing its size and/or increasing the cuticle, and physiological and biochemical adaptations such as stomatal closure to prevent water loss and accumulation of compatible solutes, including sugars and amino acids, to decrease water potential (Ψ_w) and increase water uptake.

Several authors have described that some plants are able to maintain the water uptake actively decreasing Ψ_w , through the lowering of osmotic potential (Ψ_o). The Ψ_o is determined by the concentration of osmotically active substances, especially in the vacuole, and also depending on the degree of hydration, the absolute amount of osmolytes, the tissue elasticity, and the relative distribution of water between the symplast and apoplast fractions (Girma & Krieg, 1992; Sánchez-Blanco et al., 1998). The decrease in Ψ_o may be either by passive dehydration (DH), which causes an increase in the concentration of osmolytes, or by active synthesis of osmolytes, which is known as osmotic adjustment (OA) (Levy, 1983; Chimenti et al., 2002; Martínez et al., 2004; Martínez et al., 2007; Pérez-López et al., 2010a). However, others in the same or other species have not detected OA (Coleman, 1988; Jefferies, 1993; Martínez et al., 2007; Robredo et al., 2007). OA includes the active accumulation of organic and inorganic solutes in the cell, thereby achieving a reduction of Ψ_o and an increase in the inflow of water to the cell, maintaining turgor pressure (Sánchez et al., 2004).

Nevertheless, the usefulness of OA as a mechanism of drought tolerance is controversial. Some authors have suggested that OA is a result of reduced growth by drought (Munns, 1988). Others have suggested that the OA only operates under severe water deficit, when the plant survival is threatened (Serraj & Sinclair, 2002).

Cellular water loss may result in the loss of turgor. To maintain turgor despite the lower water content, plant adjusts the cell wall elasticity (ϵ), making it more elastic (Saito & Terashima, 2004). However, it has also been observed the opposite trend, *i.e.*, the plant decreases the elasticity, making it more rigid (White et al., 2000; Martinez et al., 2007), to reduce Ψ_w with minimal loss of leaf water and, therefore, maintain the

water intake. Both strategies are considered advantageous for the plant (Schulte, 1992; Saito & Terashima, 2004).

As mentioned above, other mechanism to tolerate drought is to diminish water loss. To achieve this goal and, therefore, maintain a better water status, plants tend to reduce transpiration by stomatal closure, by reducing hydraulic conductance and/or by decreasing leaf area (Sadras et al., 1993; Liu & Stützel, 2002; Robredo et al., 2007).

In addition to increased soil drought, the future climatic conditions are expected to provoke an increase in the atmospheric concentration of CO₂, which, in general, under well-watered conditions did not affect water relations (De Luis et al., 1999; Robredo et al., 2007; Perry et al., 2013).

However, when the increase in the concentration of CO₂ acts together with drought, several studies have shown that plants have a better water status than at ambient CO₂, due to reduced transpiration rate as a result of the stomatal closure associated with increased CO₂ (Bunce, 1998; Robredo et al., 2007; Leakey et al., 2009a; Morgan et al., 2011). However, other studies have not observed differences between CO₂ concentrations (Ferris & Taylor, 1994; Tognetti et al., 1998; Ellsworth, 1999; Manderscheid et al., 2014) and even, in some studies, the effect of increased CO₂ concentration on the water status is negative (Centritto et al., 1999b; De Luis et al., 1999). Samarakoon & Gifford (1995) established that the response of the transpiration to the combined effects of elevated CO₂ and drought is determined by the relationship between the increase in leaf area and the decrease in transpiration per area induced by stomatal closure. Thus, if the decrease in transpiration per area is greater than the increase in leaf area, the total transpiration will be reduced; however, if the increase in leaf area is greater the total transpiration will increase.

Some authors have argued that, under elevated CO₂, the increased CO₂ assimilation rate would permit the plant to have more carbon skeletons to perform OA (Wall et al., 2006; Chen et al., 2015.); however, other authors have observed that due to the higher growth rate at elevated CO₂ the concentration of solutes in the leaf could

decrease, turning Ψ_o less negative and observing a minor OA (Tschaplinski et al., 1993; 1995b).

These effects of environmental factors generally have been described in plants grown in monoculture. However, the few studies that have addressed the effect of competition on water relations have shown that, when plants grow in mixture versus monoculture, the response of water relations to drought varies, being some species benefited and other affected, depending on the balance between the ability to uptake water and the loss of water by transpiration. For example, Suriyagoda et al. (2011) observed that two species of legumes lost leaves in the presence of *Lolium perenne* (but not in monoculture), due to the greater capacity of the grass to uptake water because its higher root biomass. The ability to uptake water from the soil depends on the gradient of water potential between the soil and the plant, the root biomass and the hydraulic conductance (Smith & Roberts, 2003). Therefore, to clarify the role of inter- and intraspecific competition on the effect that rising CO_2 has on plant water status and their dependence on the availability of water in the soil, water relations of plants grown in monoculture compared with those same species grown in mixture were studied.

The overall objective of this chapter is to determine the effect of drought, elevated CO_2 and the type of competition on the water relations of *Agrostis capillaris* and *Trifolium pratense*. To this end, this objective has been divided into five specific objectives:

- To study the impact of water deficit on plant water relations and to determine if there are differences in both species when they are subjected to the same period of water deficit (day 9).
- To examine the effect of water stress on water status and analyze the possible differences in both species when soil water content is equal in all treatments (day 16).
- To determine if there are differences between species in the mechanisms of drought tolerance and whether these differences vary depending on the period of drought, after 9 days without irrigation or when the soil water level is equal (day 16).

- To elucidate if the development under elevated CO₂ increases drought tolerance.
- To analyze the role of the type of competition in the response of species to water stress under conditions of ambient or elevated CO₂.

With these objectives, the hypotheses are: 1) under well-watered conditions, the water status of the plants will not be affected by the increase in atmospheric CO₂ concentration and the type of competition. 2) During the period of progressive drought, the higher growth of the leaves of Tp compared to the ones of Ac and the higher transpiration rate will cause the soil water content in the monoculture of Tp to be lower than in the monoculture of Ac. This will cause the water status of Tp to be more affected. 3) During the period of homogeneous drought, all treatments will have the same amount of water in the soil, so those plants that can develop mechanisms of drought tolerance will present a greater turgor potential and leaf water content. 4) Under combined conditions of elevated CO₂ and drought, the negative effect of drought will be partially mitigated, due to reduced water loss at elevated CO₂ due to higher stomatal closure and the increase availability of carbon skeletons for use in the synthesis of compatible osmolytes. 5) The competition between the two species will cause a worse water status of Ac, due to the increased capacity of water uptake of Tp through greater root biomass.

4.2. Results

4.2.1. Soil water status

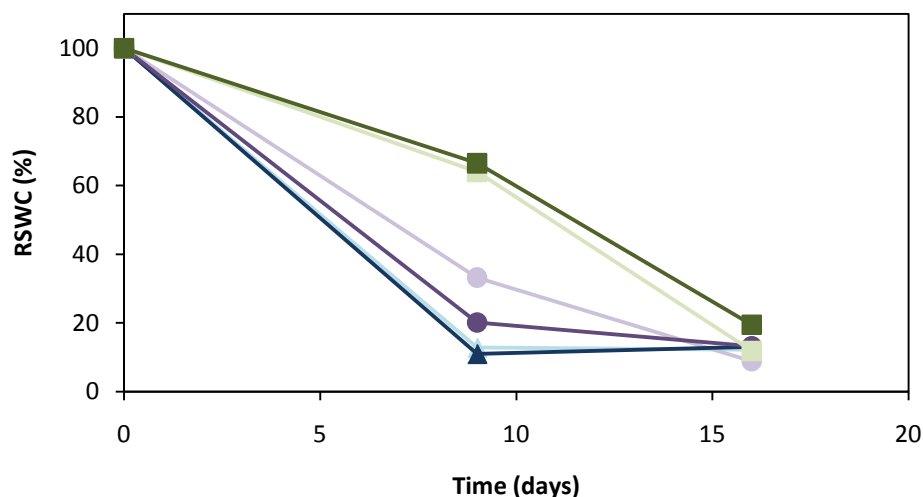


Fig. 4.1. Effects of CO₂ and competition on relative soil water content (RSWC) of droughted pots. Light blue triangles denote the monoculture of Tp at ambient CO₂ and dark blue triangles denote the monoculture of Tp at elevated CO₂; light green squares denote the monoculture of Ac at ambient CO₂ and dark green squares denote the monoculture of Ac at elevated CO₂; light purple circles denote the mixture at ambient CO₂ and dark purple circles denote the mixture at elevated CO₂.

When plants were 9 days without watering each treatment reached different relative soil water content (RSWC) (Fig. 4.1). Thus, the value of the monoculture of Tp approximate dropped to 12%, regardless of the concentration of CO₂. The RSWC of the monoculture of Ac decreased to 65%, whatever the concentration of CO₂. The mixture treatment had an intermediate behavior, decreasing to 33% at ambient CO₂ and to 20% at elevated CO₂. On day 16, all treatments were maintained at 15% volumetric soil water content (θ_v) with respect to control, therefore all treatments showed a similar RSWC, approximately 12% (Fig. 4.1).

4.2.2. Leaf water status in progressive drought

In well-watered conditions, the leaf relative water content (RWC) of Tp was approximately 93% and the one of Ac, 98%, not affecting them either the type of competition or the CO₂ concentration (Fig. 4.2). After nine days in water deficit, the RWC of Tp in monoculture was reduced to 75%, regardless of the concentration of CO₂ (Fig. 4.2). When Tp was growing in mixture at ambient CO₂, RWC did not decrease, while at elevated CO₂ it diminished to 87%. In Ac, the changes were minor, in monoculture, the RWC only dropped at ambient CO₂, while in mixture the reduction occurred at elevated CO₂, although in both cases with values above 90%.

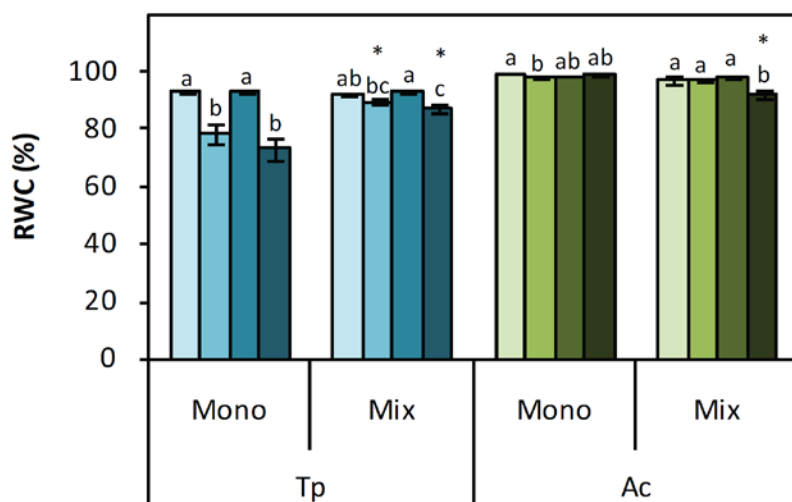


Fig. 4.2. Effects of drought, CO₂, and competition on relative water content (RWC) in day 9th. Lightest bars represent well-watered plants at ambient CO₂, light bars represent drought plants at ambient CO₂, dark bars represent well-watered plants at elevated CO₂, and darkest bars represent drought plants at elevated CO₂. Different letters indicate significant differences at $P \leq 0.05$ within the same species and type of competition. * indicates differences within the same species between monoculture and mixture.

Under well-watered conditions, no changes were detected in either the water potential or osmotic potential of the leaf, at dawn (Ψ_{wpd} and Ψ_{opd}) as well as at midday (Ψ_{wmd} and Ψ_{omd}), regardless of the CO₂ concentration and the type of competition (Fig. 4.3). After 9 days without watering the Ψ_{wpd} of the monoculture of Tp decreased

approximately to -0.9 MPa, regardless of the concentration of CO₂ (Fig. 4.3A), while Ψ_{wmd} dropped to -1.15 MPa, at ambient CO₂ and at elevated CO₂ (Fig. 4.3B). When Tp grew in mixture statistically significant differences were detected only at elevated CO₂, where Ψ_{wmd} fell to -0.58 MPa. In Ac no differences were detected in monoculture in Ψ_{wpd} and in Ψ_{wmd} ; however, in mixture, Ψ_{wpd} and Ψ_{wmd} decreased slightly at elevated CO₂.

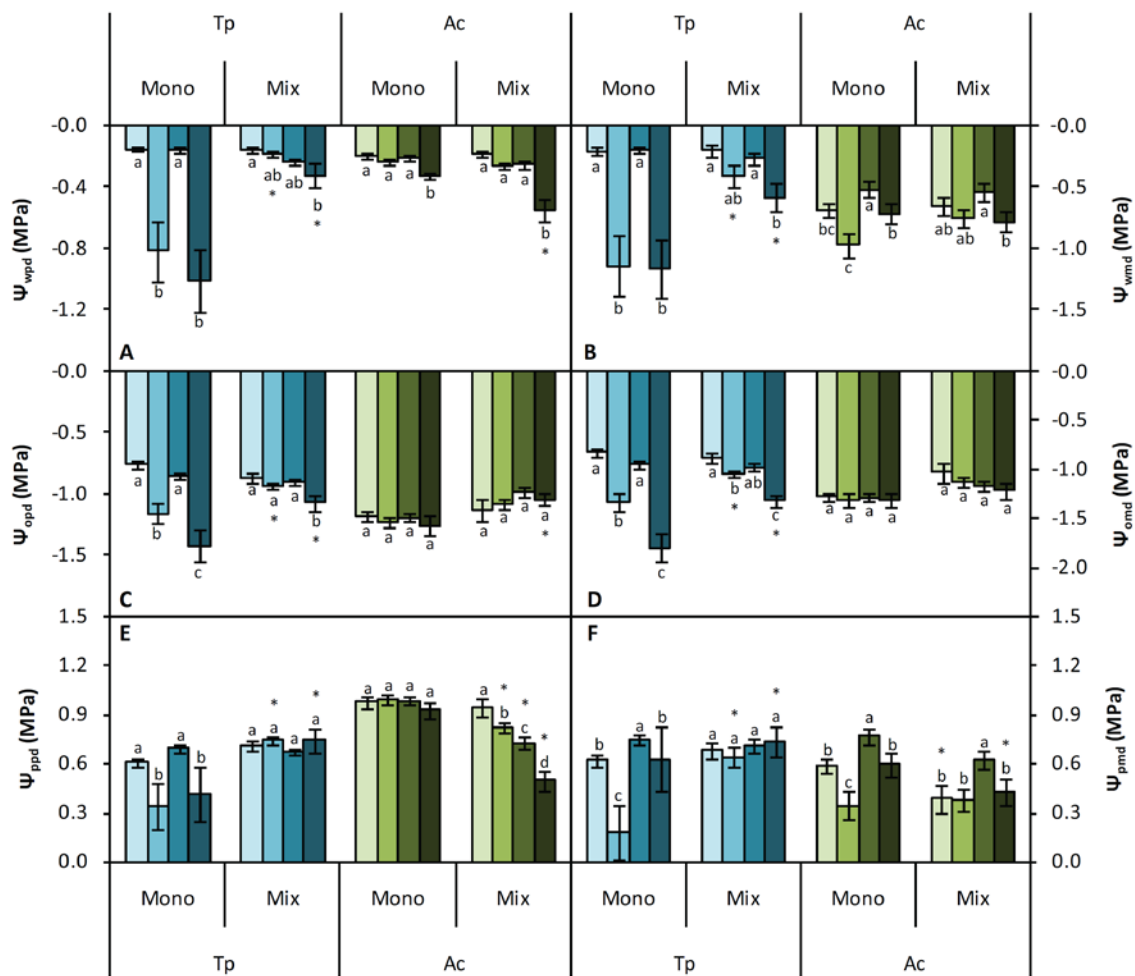


Fig. 4.3. Effects of drought, CO₂, and competition on leaf predawn water potential (Ψ_{wpd} ; A), leaf midday water potential (Ψ_{wmd} ; B), leaf predawn osmotic potential (Ψ_{opd} ; C), leaf midday osmotic potential (Ψ_{omd} ; D), leaf predawn turgor potential (Ψ_{ppd} ; E), and leaf midday turgor potential (Ψ_{pmd} ; F) in day 9th. Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 4.2.

On day 9 in drought, the Ψ_{opd} of Tp decreased to -1.2 MPa and -1.4 MPa at ambient CO₂ and elevated CO₂, respectively (Fig. 4.3C). The Ψ_{omd} followed the same trend as the Ψ_{opd} , but the absolute values were slightly more negative (Fig. 4.3D). When Tp grew in mixture the Ψ_{opd} decreased only under elevated CO₂, while the Ψ_{omd} decreased under both CO₂ concentrations, to -1.0 MPa at ambient CO₂ and to -1.3 MPa at elevated CO₂. In Ac no differences were observed in Ψ_{opd} and in Ψ_{omd} among treatments under both CO₂ concentrations and in both types of competition.

On day 9 the turgor potentials at dawn (Ψ_{ppd}) and at midday (Ψ_{pmd}) of Tp in well-watered conditions were generally about 0.75 MPa, regardless of the concentration of CO₂ and the type of competition (Fig. 4.3E, F). Ac showed higher values of Ψ_{ppd} than Tp in well-watered conditions, but lower values of Ψ_{pmd} . After 9 days of drought the turgor potential of Tp only decreased in monoculture, reaching the Ψ_{pmd} 0.18 MPa and 0.63 MPa at ambient and elevated CO₂, respectively. In Ac, the turgor potential only diminished in mixture at elevated CO₂, where Ψ_{ppd} decreased to 0.50 and Ψ_{pmd} to 0.31 MPa.

4.2.3. Leaf water status in homogeneous drought

In the 16 day, all treatments in drought conditions presented values of RSWC *circa* 12%, and differences in the behavior of the species were observed and also depending on the type of competition. In Tp, the RWC was between 70-75% (Fig. 4.4), regardless of the concentration of CO₂ and the type of competition. By contrast, in Ac differences dependent on the type of competition were observed; thus, in monoculture the decrease in RWC was lower than in mixture, reaching values of 91% and 95% at ambient and elevated CO₂, respectively. In mixture, Ac reached values of 70%, regardless of the concentration of CO₂.

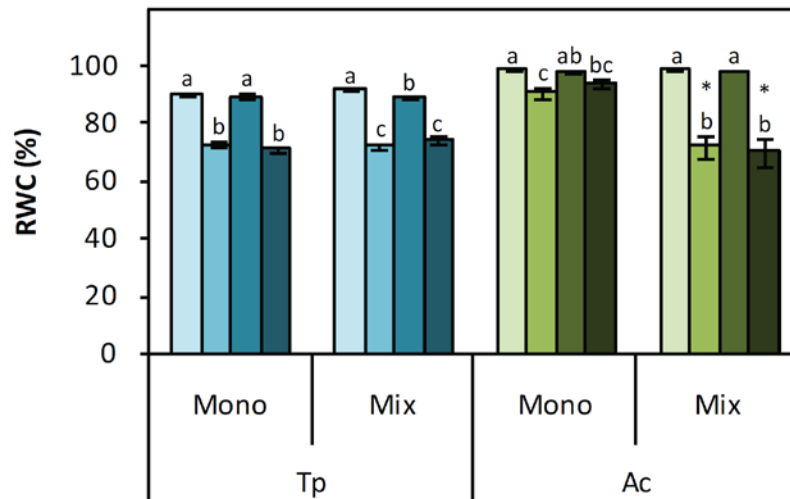


Fig. 4.4. Effects of drought, CO₂, and competition on relative water content (RWC) in day 16th. Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 4.2.

As it happened on the day 9, on day 16 under well-watered conditions, neither the elevated CO₂ nor the type of competition changed the values of water and osmotic potential in both species (Fig. 4.5). After 16 days of drought, the Ψ_{wpd} of Tp decreased to -0.75 MPa at ambient CO₂, regardless of the type of competition, and at elevated CO₂ it diminished to -1.1 and -0.9 MPa in monoculture and mixture, respectively (Fig. 4.5A). Moreover, the Ψ_{wmd} of Tp decreased to -1.8 MPa, regardless of the concentration of CO₂ and the type of competition (Fig. 4.5B). In Ac, the declines were dependent on the type of competition; thus, at ambient CO₂, the Ψ_{wpd} of the monoculture of Ac was reduced to -0.7 MPa, while in mixture reached -1.0 MPa. The elevated CO₂ partially mitigated the effect of drought in monoculture, but not in mixture, where at elevated CO₂ the decline was slightly higher. The Ψ_{wmd} of Ac in drought was similar in both types of competition at ambient CO₂ (-1.5 MPa); however, at elevated CO₂, differences dependent on the type of competition were found, showing a smaller decline in monoculture, to -1.0 MPa, and a higher decline in mixture, to -1.8 MPa.

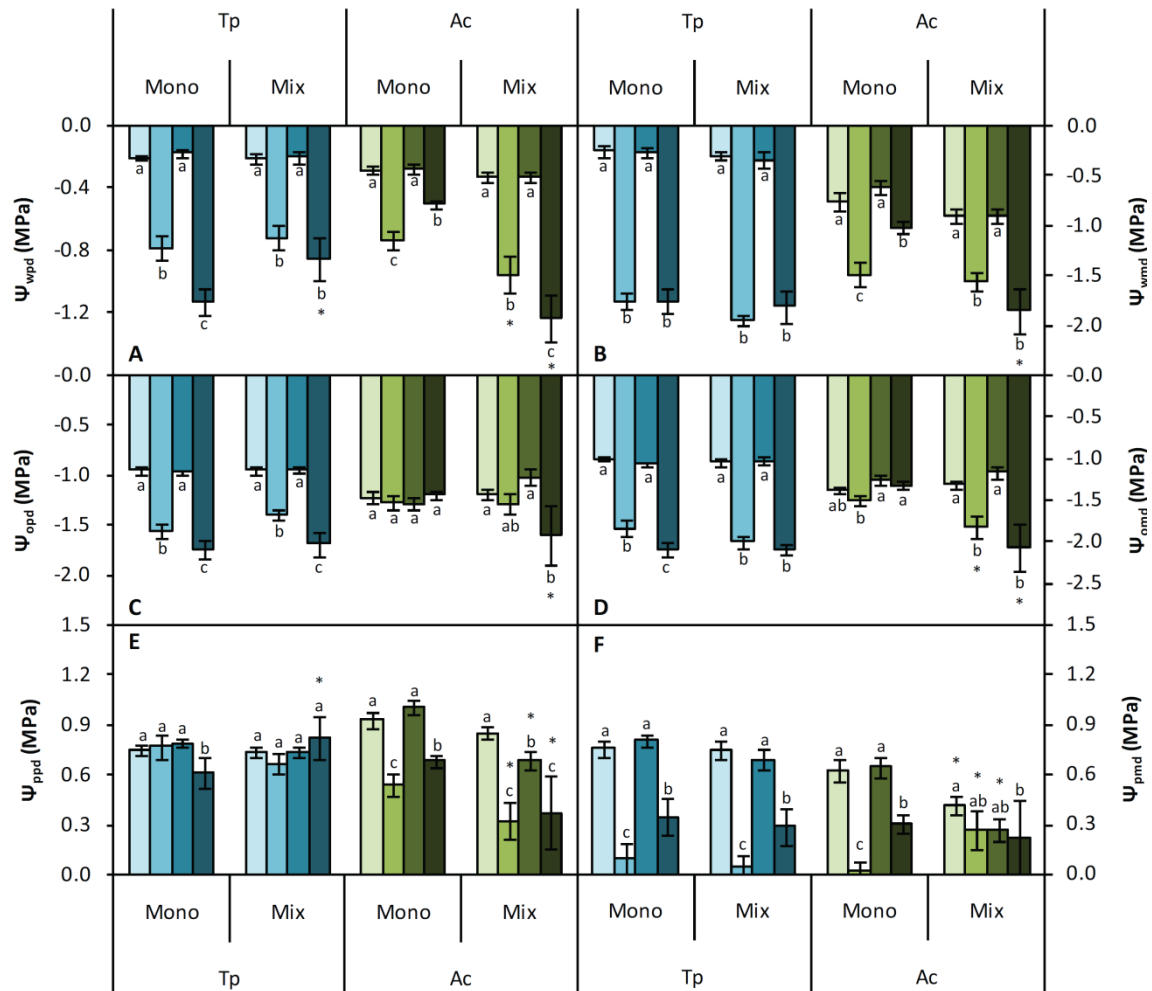


Fig. 4.5. Effects of drought, CO₂, and competition on leaf predawn water potential (Ψ_{wpd} ; A), leaf midday water potential (Ψ_{wmd} ; B), leaf predawn osmotic potential (Ψ_{opd} ; C), leaf midday osmotic potential (Ψ_{omd} ; D), leaf predawn turgor potential (Ψ_{ppd} ; E), and leaf midday turgor potential (Ψ_{pmd} ; F) in day 16th. Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 4.2.

After 16 days of drought, in Tp, as it happened in the water potential, no differences between the behavior of monoculture and mixture either in the Ψ_{opd} or in the Ψ_{omd} (Fig. 4.5C,D) were detected. The Ψ_{opd} dropped to values *circa* -1.45 MPa at ambient CO₂ and to -1.7 MPa at elevated CO₂. The Ψ_{omd} decreased to -1.9 and -2.1 MPa at ambient and elevated CO₂, respectively. In Ac, no differences were observed in monoculture. However, when Ac grew in mixture, Ψ_{opd} decreased to -1.6 MPa at elevated CO₂, and the Ψ_{omd} diminished to -1.8 MPa and -2.1 MPa, at ambient and elevated CO₂, respectively.

After 16 days of drought, the Ψ_{ppd} of Tp was not modified; however, the Ψ_{pmd} decreased to 0.09 MPa and 0.05 MPa at ambient CO₂ in monoculture and mixture, respectively (Fig. 4.5E,F). When the plants grew at elevated CO₂, the decline was smaller and was also depending on the type of competition like at ambient CO₂, *i.e.*, a greater decrease in mixture than in monoculture. In Ac, drought affected Ψ_{ppd} as well as Ψ_{pmd} . Under ambient CO₂, the Ψ_{pmd} reached values of 0.01 and 0.26 MPa in monoculture and mixture, respectively. The effect of elevated CO₂ was dependent on the type of competition, thus, in monoculture, it alleviated the drop of Ψ_{pmd} , while in mixture did not produce any change.

4.2.4. Osmotic adjustment, dehydration and volumetric elasticity modulus in progressive drought

Tp decreased (more negative) its osmotic potential at full turgor (Ψ_o^{100}) after 9 days of drought only in monoculture at ambient CO₂, while at elevated CO₂ the decreases were higher and in both types of competition, about 0.2 MPa (Table 4.1). Ac, instead, did not change its Ψ_o^{100} in response to drought. As a result of these circumstances, osmotic adjustment (OA) was detected in the monoculture of Tp at ambient CO₂ and at elevated CO₂ in both types of competition, while Ac did not present OA. Dehydration values (DH) in drought were superior to OA in both species, and the values of Tp higher than the ones of Ac. In Tp, the increase in DH was dependent on the type of competition and the concentration of CO₂, thus, in monoculture, DH was two times higher than in mixture, and at elevated CO₂ a 50% higher than at ambient CO₂. In Ac there were no differences among treatments.

The volumetric elasticity modulus (ϵ) was higher in Ac than in Tp and in both species it was lower in mixture than in monoculture (Table 4.1). After 9 days in drought conditions, the ϵ of Tp in mixture decreased by 15% at ambient CO₂, and in the case of Tp in monoculture, ϵ was reduced by 32% at elevated CO₂, remaining constant in all other treatments. In Ac, drought reduced ϵ by 74% at ambient CO₂ in monoculture,

while elevated CO₂ increased it. In mixture, the decrease in ε was smaller than in monoculture, 7% at ambient CO₂ and 59% at elevated CO₂.

Table 4.1. Effects of drought, CO₂, and competition on osmotic potential at full turgor (Ψ_o^{100} ; MPa), osmotic adjustment (OA; MPa), dehydration (DH; MPa), and volumetric elasticity modulus (ε ; MPa) in day 9th. Tp denotes *Trifolium pratense*; Ac, *Agrostis capillaris*; Mono, monoculture; Mix, mixture; D, drought; WW, well-watered.

| | | Tp | | | | Ac | | | |
|----------------|------|------------------------------|-------|------------------------------|-------|------------------------------|-------|------------------------------|-------|
| | | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | |
| | | WW | D | WW | D | WW | D | WW | D |
| Ψ_o^{100} | Mono | -0.85 | -0.90 | -0.92 | -1.10 | -1.31 | -1.20 | -1.28 | -1.25 |
| | Mix | -0.85 | -0.83 | -0.85 | -1.02 | -1.13 | -1.08 | -1.08 | -1.09 |
| OA | Mono | | 0.05 | | 0.19 | | -0.10 | | -0.03 |
| | Mix | | -0.02 | | 0.17 | | -0.05 | | 0.01 |
| DH | Mono | -0.03 | 0.43 | 0.03 | 0.69 | -0.04 | 0.11 | 0.00 | 0.05 |
| | Mix | 0.03 | 0.22 | 0.12 | 0.30 | -0.10 | 0.04 | 0.08 | 0.12 |
| ε | Mono | 3.33 | 3.31 | 2.62 | 1.78 | 166.28 | 42.57 | 40.81 | 98.66 |
| | Mix | 2.12 | 1.79 | 2.20 | 2.22 | 28.88 | 26.92 | 21.77 | 8.86 |

On day 9, under well-watered conditions, the concentration of soluble sugars was 50% higher in Tp than in Ac, regardless of the type of competition and the concentration of CO₂ (Fig. 4.6A), therefore, under well-watered conditions, the type of competition and the concentration of CO₂ did not affect significantly the concentration of sugars. At ambient CO₂, drought increased the concentration of sugars of Tp by 42% in monoculture and by 22% in mixture, while at elevated CO₂ the changes were higher, 71% and 192% in monoculture and mixture, respectively. In Ac, drought did not provoke significant differences in the concentration of soluble sugars on day 9.

Proline concentration is shown in Figure 4.6B. Under well-watered conditions, either the elevated CO₂ or the type of competition did not affect the concentration of proline. After 9 days of drought, the proline concentration of Tp increased 5 times at ambient CO₂, regardless of the type of competition. At elevated CO₂, proline

concentration in monoculture increased 9 times and in mixture 2.5 times, compared to plants grown at elevated CO₂ under well-watered conditions. In Ac, no differences were detected in the concentration of proline in monoculture, while in mixture at elevated CO₂ the concentration of proline increased 6 times.

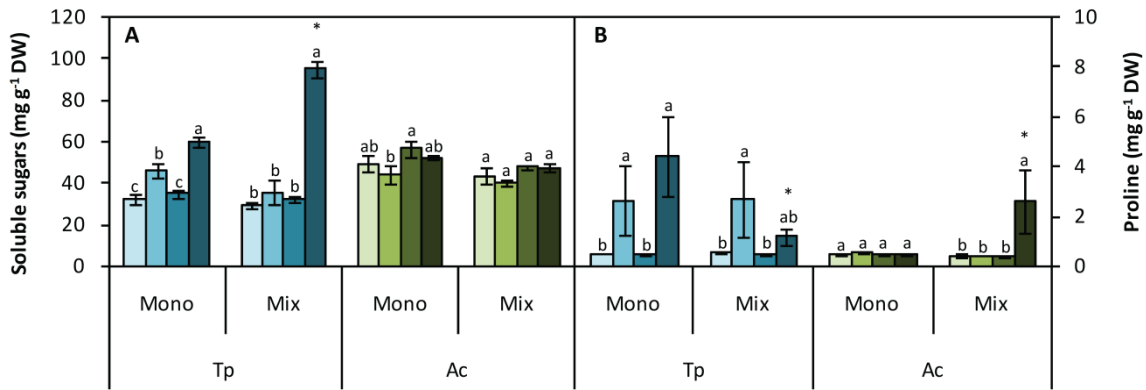


Fig. 4.6. Effects of drought, CO₂, and competition on soluble sugars concentration (A) and proline concentration (B) in day 9th. Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 4.2.

Analyzing the contribution of different solutes to the Ψ_o^{100} on day 9, under well-watered conditions, in both species, the greatest contribution was the one of the inorganic ions, about 60%, regardless of the CO₂ concentrations and the type competition (Table 4.2). Within the inorganic ions, it is worth noting the role of K⁺ with 30% in Tp and 50% in Ac, the role of Ca²⁺ with 20% in Tp and 4% in Ac, and the role of Mg²⁺ with 10% in Tp and 5% in Ac. The organic compounds analyzed contributed approximately by 4% in Tp and 5% in Ac; in mixture, this contribution of organic compounds decreased slightly in both species. The contribution of proline was 0.15% in both species, regardless of the type of competition, and the one of sugars was 4% in Tp and 5% in Ac. At elevated CO₂ the contribution of organic solutes increased to 5% in Tp and 6% in Ac, due to the increase in the sugar contribution.

Table 4.2A. Effects of drought, CO₂, and competition on the contribution of solutes (MPa) to the Ψ_o^{100} in day 9th in Tp; in brackets the percentage of contribution of each solute.

| | | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | | |
|------------------|-------------|------------------------------|--------|-------|--------|------------------------------|--------|-------|---------|
| | | WW | | D | | WW | | D | |
| Ψ_o^{100} | Monoculture | -0.85 | | -0.90 | | -0.92 | | -1.10 | |
| | Mixture | -0.85 | | -0.83 | | -0.85 | | -1.02 | |
| K ⁺ | Monoculture | -0.25 | (29.7) | -0.27 | (30.4) | -0.29 | (31.1) | -0.29 | (26.8) |
| | Mixture | -0.28 | (33.1) | -0.29 | (34.9) | -0.25 | (29.3) | -0.29 | (28.1) |
| Ca ²⁺ | Monoculture | -0.18 | (20.9) | -0.19 | (21.7) | -0.18 | (19.2) | -0.21 | (19.5) |
| | Mixture | -0.18 | (21.7) | -0.19 | (23.4) | -0.18 | (21.6) | -0.22 | (21.6) |
| Mg ²⁺ | Monoculture | -0.09 | (10.4) | -0.10 | (11.1) | -0.09 | (10.1) | -0.11 | (10.4) |
| | Mixture | -0.09 | (10.2) | -0.09 | (11.0) | -0.09 | (11.1) | -0.10 | (10.2) |
| Inorganic | Monoculture | -0.52 | (61.4) | -0.57 | (63.7) | -0.56 | (60.8) | -0.63 | (57.0) |
| | Mixture | -0.56 | (65.5) | -0.58 | (69.8) | -0.53 | (62.6) | -0.62 | (60.7) |
| Sugars | Monoculture | -0.03 | (4.08) | -0.06 | (6.27) | -0.04 | (4.78) | -0.10 | (8.70) |
| | Mixture | -0.03 | (3.48) | -0.04 | (5.14) | -0.04 | (4.39) | -0.12 | (11.90) |
| Proline | Monoculture | -0.00 | (0.16) | -0.01 | (0.84) | -0.00 | (0.15) | -0.01 | (1.31) |
| | Mixture | -0.00 | (0.17) | -0.01 | (0.94) | -0.00 | (0.16) | -0.00 | (0.38) |
| Organics | Monoculture | -0.04 | (4.24) | -0.06 | (7.11) | -0.05 | (4.94) | -0.11 | (10.00) |
| | Mixture | -0.03 | (3.65) | -0.05 | (6.09) | -0.04 | (4.55) | -0.13 | (12.28) |
| Others | Monoculture | -0.29 | (34.4) | -0.26 | (29.2) | -0.32 | (34.2) | -0.36 | (33.0) |
| | Mixture | -0.26 | (30.8) | -0.20 | (24.1) | -0.28 | (32.9) | -0.28 | (27.0) |

After 9 days in drought, the contribution of the three major inorganic ions increased at ambient CO₂ in Tp, but at elevated CO₂ it decreased due to a lower contribution of K⁺ (Table 4.2A). The contribution of organic compounds in Tp increased by 67% in monoculture and in mixture at ambient CO₂, reaching the contribution of proline about 0.9% and the one of sugars 6.3% in monoculture and 5.1% in mixture. At elevated CO₂, the increase in the contribution of the organic compounds was higher than at ambient CO₂, by 100% in monoculture and by 170% in mixture. In monoculture, the contribution of sugars increased to 8.7% and the one of proline to 1.3%; in mixture, the contribution rates were 11.9% and 0.4% for sugars and proline,

respectively. In Ac, no significant changes were observed in the contribution of solutes, except at elevated CO₂ in mixture, where the contribution of K⁺ decreased from 48% to 44% and the contribution of organic compounds increased from 4.9% to 7.2%, due to the increase in proline (541%) and sugars (35%), compared to plants grown under well-watered conditions and at elevated CO₂ (Table 4.2B).

Table 4.2B. Effects of drought, CO₂, and competition on the contribution of solutes (MPa) to the Ψ_o^{100} in day 9th in Ac; in brackets the percentage of contribution of each solute.

| | | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | | |
|------------------|-------------|------------------------------|--------|-------|--------|------------------------------|--------|-------|--------|
| | | WW | | D | | WW | | D | |
| Ψ_o^{100} | Monoculture | -1.31 | | -1.20 | | -1.28 | | -1.25 | |
| | Mixture | -1.13 | | -1.08 | | -1.08 | | -1.09 | |
| K ⁺ | Monoculture | -0.62 | (47.0) | -0.61 | (50.6) | -0.63 | (49.3) | -0.60 | (48.1) |
| | Mixture | -0.57 | (50.4) | -0.55 | (50.6) | -0.52 | (48.1) | -0.48 | (44.3) |
| Ca ²⁺ | Monoculture | -0.06 | (4.5) | -0.04 | (3.5) | -0.05 | (3.7) | -0.04 | (3.1) |
| | Mixture | -0.04 | (3.5) | -0.04 | (3.8) | -0.03 | (3.2) | -0.04 | (3.6) |
| Mg ²⁺ | Monoculture | -0.07 | (5.3) | -0.06 | (5.2) | -0.07 | (5.5) | -0.06 | (4.8) |
| | Mixture | -0.06 | (5.2) | -0.06 | (5.9) | -0.05 | (5.1) | -0.05 | (5.0) |
| Inorganic | Monoculture | -0.75 | (57.6) | -0.72 | (60.0) | -0.76 | (59.3) | -0.71 | (56.6) |
| | Mixture | -0.68 | (60.0) | -0.66 | (61.2) | -0.62 | (57.2) | -0.58 | (53.6) |
| Sugars | Monoculture | -0.07 | (5.12) | -0.05 | (4.56) | -0.08 | (6.04) | -0.07 | (5.54) |
| | Mixture | -0.05 | (4.26) | -0.05 | (4.22) | -0.05 | (4.77) | -0.07 | (6.45) |
| Proline | Monoculture | -0.00 | (0.16) | -0.00 | (0.16) | -0.00 | (0.14) | -0.00 | (0.14) |
| | Mixture | -0.00 | (0.13) | -0.00 | (0.13) | -0.00 | (0.12) | -0.01 | (0.77) |
| Organics | Monoculture | -0.07 | (5.28) | -0.06 | (4.72) | -0.08 | (6.19) | -0.07 | (5.68) |
| | Mixture | -0.05 | (4.39) | -0.05 | (4.35) | -0.05 | (4.89) | -0.08 | (7.22) |
| Others | Monoculture | -0.49 | (37.2) | -0.42 | (35.3) | -0.44 | (34.5) | -0.47 | (37.7) |
| | Mixture | -0.40 | (35.6) | -0.37 | (34.4) | -0.41 | (38.0) | -0.43 | (39.2) |

4.2.5. Osmotic adjustment, dehydration and volumetric elasticity modulus in homogeneous drought

Tp reduced (more negative) its Ψ_o^{100} after 16 days of drought in a higher percentage than on day 9 (Table 4.3). At ambient CO₂ the values of Tp were on average -1.27 MPa in both types of competition, while at elevated CO₂ the values were 5% more negative (-1.35 MPa). In contrast, in Ac, the declines caused by drought in Ψ_o^{100} were dependent on the type of competition; thus, in monoculture, it was not affected, but in mixture, Ψ_o^{100} reached values of -1.41 at ambient CO₂, and of -1.29 MPa at elevated CO₂. These higher Ψ_o^{100} decreases on day 16 than on day 9 resulted in a higher OA in both species. In the case of Tp, OA was independent of the type of competition, but dependent on the concentration of CO₂, OA was higher at elevated CO₂. In Ac, in contrast, OA was recorded only in mixture with similar values in both concentrations of CO₂. Drought increased the DH of Tp at ambient CO₂ to 0.58 MPa and 0.72 MPa in monoculture and mixture, respectively. The elevated CO₂ increased DH in monoculture, but had no effect in mixture. In Ac, DH was lower than in Tp, thus, in monoculture DH was 0.19 MPa and in mixture 0.41 MPa at ambient CO₂. The elevated CO₂ increased DH in mixture to 0.77 MPa.

On day 16, as it happened after 9 days of drought, ε was also higher in Ac than in Tp (Table 4.3). Drought caused an increase in the ε of Tp of 3-3.5 times in monoculture compared to plants grown under well-watered conditions, regardless of the concentration of CO₂. In mixture, there were differences between the concentrations of CO₂, at ambient CO₂, ε increased by 135%, and by 85% at elevated CO₂. In Ac, drought reduced ε by 70% in monoculture and by 93% in mixture, regardless of the concentration of CO₂.

Table 4.3. Effects of drought, CO₂, and competition on osmotic potential at full turgor (Ψ_o^{100} ; MPa), osmotic adjustment (OA; MPa), dehydration (DH; MPa), and volumetric elasticity modulus (ϵ ; MPa) in day 16th.

| | | Tp | | | | Ac | | | |
|----------------|-------------|------------------------------|-------|------------------------------|-------|------------------------------|-------|------------------------------|-------|
| | | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | |
| | | WW | D | WW | D | WW | D | WW | D |
| Ψ_o^{100} | Monoculture | -0.90 | -1.26 | -0.91 | -1.34 | -1.27 | -1.30 | -1.30 | -1.14 |
| | Mixture | -0.90 | -1.28 | -0.93 | -1.33 | -1.14 | -1.41 | -1.07 | -1.29 |
| OA | Monoculture | | 0.36 | | 0.43 | | 0.03 | | -0.16 |
| | Mixture | | 0.38 | | 0.40 | | 0.27 | | 0.23 |
| DH | Monoculture | 0.10 | 0.58 | 0.16 | 0.76 | 0.11 | 0.19 | -0.05 | 0.18 |
| | Mixture | 0.14 | 0.72 | 0.10 | 0.77 | 0.18 | 0.41 | 0.10 | 0.77 |
| ϵ | Monoculture | 1.49 | 4.36 | 1.00 | 3.48 | 88.11 | 14.33 | 42.53 | 14.47 |
| | Mixture | 1.92 | 4.44 | 2.18 | 4.04 | 59.72 | 4.14 | 62.42 | 3.65 |

In both species, a negative correlation between the concentration of hemicellulose and the volumetric elasticity modulus was detected, independent of the type of competition and the concentration of CO₂ (Fig. 4.7).

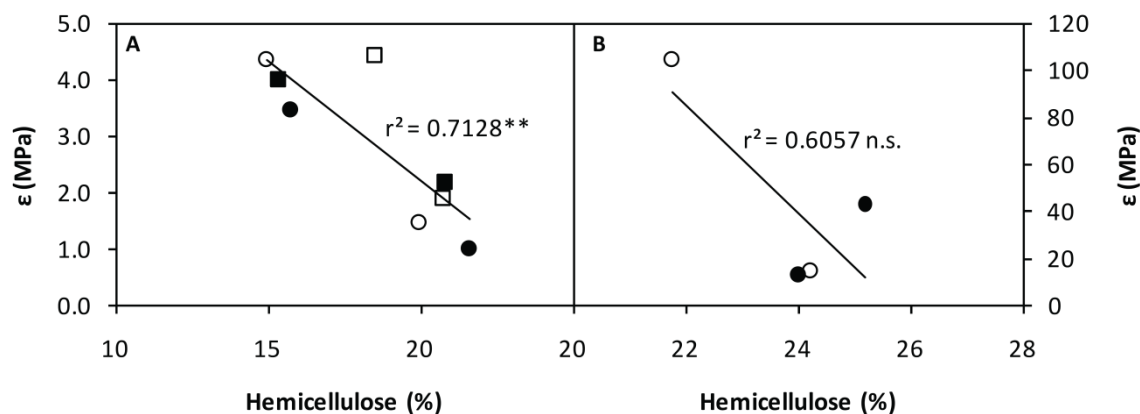


Fig. 4.7. Relation between hemicellulose concentration and ϵ in Tp (A) and in Ac (B) grown at ambient (open symbols) or elevated (closed symbols) CO₂ concentration and in monoculture (circles) or in mixture (squares). No significant differences between CO₂ concentrations were observed. The symbols used *, **, *** indicate significant correlation at 5%, 1% and 0.1%, respectively.

On day 16, under well-watered conditions and at ambient CO₂ the concentration of soluble sugars was 65% higher in Tp than in Ac in monoculture and 78% in mixture (Fig. 4.8A). Under well-watered conditions, the type of competition did not significantly affect the concentration of sugars. The elevated CO₂ increased the concentration of soluble sugars in Tp by 21% in monoculture and by 33% in mixture. After 16 days of drought at ambient CO₂, the concentration of sugars of Tp increased by 63% and 74% in monoculture and mixture, respectively, while at elevated CO₂ the increases were of 70% in monoculture and of 43% in mixture. In Ac, drought did not produce significant differences in the concentration of soluble sugars in monoculture regardless of the concentrations of CO₂, while, in mixture, sugar concentration increased by 57% at elevated CO₂.

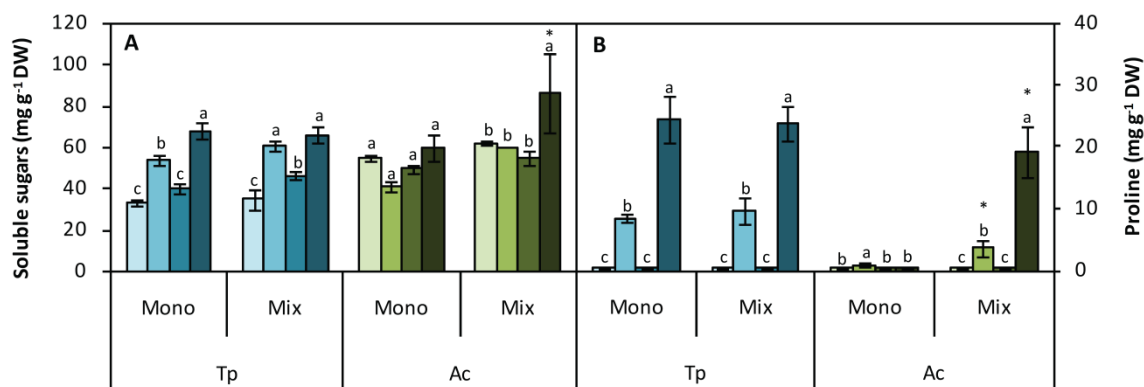


Fig. 4.8. Effects of drought, CO₂, and competition on soluble sugars concentration (A) and proline concentration (B) in day 16th. Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 4.2.

After 16 days of drought under ambient CO₂, the proline concentration of Tp in monoculture was about 20 times higher compared to plants under well-watered conditions, regardless of the type of competition (Fig. 4.8B). When Tp was grown at elevated CO₂, the increase was greater, the proline concentration rose about 60 times in drought plants, regardless of the type of competition. In the case of Ac in monoculture, no differences in the concentration of proline between treatments were detected. However, in mixture, Ac exhibited increases at ambient CO₂ (8 times) and at elevated CO₂ (47 times) compared to plants under well-watered conditions.

The contribution of solutes to Ψ_o^{100} on day 16 is shown in Table 4.4. As it happened on day 9, the largest contribution, expressed as a percentage, was the inorganic ions in both species, with close to 60% in well-watered conditions. The organic compounds analyzed were approximately 5% in Tp and 6% in Ac, which meant an increase from the day 9, mainly due to the increased contribution of sugars. Proline maintained its contribution of around 0.15% in the two species, regardless of the type of competition, and the contribution of sugars was 5% in Tp and 6% in Ac, again independent of the type of competition. The elevated CO_2 increased the contribution of organic solutes in Tp, up to 6% in monoculture and up to 8% in mixture due to an increase in the contribution of sugars.

In the homogeneous drought period (day 16), the contribution of inorganic ions to Ψ_o^{100} of Tp grown at ambient CO_2 was not affected. By contrast, in mixture, the contribution decreased from 64% to 59% (Table 4.4A). In both types of competition the contribution of K^+ was reduced, but in the case of monoculture that fact did not result in a decline in the contribution of inorganic ions because the contribution of Mg^{2+} increased. The organic compounds doubled their contribution, up to 11% in monoculture and 12% in mixture at ambient CO_2 . If the contribution of the organic compounds is broken down, it can be seen that sugars increased to 8-9% and proline to 3%. Under combined conditions of elevated CO_2 and drought, the contribution of organic compounds analyzed rose to 19%, regardless of the type of competition, due to an increase in the contribution of sugars and proline, reaching 10.5% and 8.5%, respectively.

In Ac at ambient CO_2 , drought increased the contribution of inorganic ions to 57% in monoculture and to 62.5% in mixture (Table 4.4B). Instead, the organic solutes increased only in mixture where the contribution was 8.6%, increasing the proline as well as the sugars. At elevated CO_2 , the effect of drought on the contribution of the solutes was higher, thus, the contribution of inorganic ions increased to 63% in monoculture and up to 77% in mixture. The increase in inorganic ions was mainly due to an increase in the contribution of K^+ , but also due to a slightly increase in the contribution of Ca^{2+} and Mg^{2+} . The contribution of organic solutes grew up to 8.6% and 20.5% in monoculture and mixture, respectively. In monoculture the increase was

provoked by the increase in sugars, while in mixture, the proline increased its contribution more than the one of sugars, compared to plants grown at high CO₂ under well-water conditions.

Table 4.4A. Effects of drought, CO₂, and competition on the contribution of solutes (MPa) to the Ψ_o^{100} in day 16th in Tp; in brackets the percentage of contribution of each solute.

| | | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | | |
|------------------|-------------|------------------------------|--------|-------|---------|------------------------------|--------|-------|---------|
| | | WW | | D | | WW | | D | |
| Ψ_o^{100} | Monoculture | -0.90 | | -1.26 | | -0.91 | | -1.34 | |
| | Mixture | -0.90 | | -1.28 | | -0.93 | | -1.33 | |
| K ⁺ | Monoculture | -0.29 | (32.5) | -0.39 | (30.6) | -0.25 | (27.5) | -0.33 | (24.8) |
| | Mixture | -0.31 | (34.5) | -0.39 | (30.4) | -0.35 | (37.6) | -0.34 | (25.9) |
| Ca ²⁺ | Monoculture | -0.19 | (20.6) | -0.26 | (20.8) | -0.19 | (20.6) | -0.33 | (24.6) |
| | Mixture | -0.18 | (20.3) | -0.25 | (19.9) | -0.25 | (26.7) | -0.32 | (23.9) |
| Mg ²⁺ | Monoculture | -0.09 | (9.8) | -0.14 | (10.0) | -0.09 | (10.0) | -0.17 | (12.4) |
| | Mixture | -0.09 | (9.7) | -0.12 | (9.4) | -0.13 | (13.6) | -0.16 | (12.2) |
| Inorganic | Monoculture | -0.57 | (63.5) | -0.80 | (63.5) | -0.53 | (58.4) | -0.83 | (62.2) |
| | Mixture | -0.58 | (65.0) | -0.77 | (60.0) | -0.73 | (78.7) | -0.83 | (62.4) |
| Sugars | Monoculture | -0.04 | (4.60) | -0.10 | (8.25) | -0.05 | (5.95) | -0.14 | (10.38) |
| | Mixture | -0.04 | (4.85) | -0.11 | (8.93) | -0.07 | (7.69) | -0.14 | (10.44) |
| Proline | Monoculture | -0.00 | (0.15) | -0.04 | (2.88) | -0.00 | (0.15) | -0.12 | (8.58) |
| | Mixture | -0.00 | (0.16) | -0.04 | (3.24) | -0.00 | (0.16) | -0.12 | (8.75) |
| Organics | Monoculture | -0.04 | (4.74) | -0.14 | (11.13) | -0.06 | (6.10) | -0.25 | (18.96) |
| | Mixture | -0.05 | (5.01) | -0.16 | (12.17) | -0.07 | (7.89) | -0.26 | (19.19) |
| Others | Monoculture | -0.29 | (31.8) | -0.32 | (25.3) | -0.32 | (35.5) | -0.25 | (18.9) |
| | Mixture | -0.27 | (30.1) | -0.36 | (27.8) | -0.13 | (13.5) | -0.24 | (18.4) |

Table 4.4B. Effects of drought, CO₂, and competition on the contribution of solutes (MPa) to the Ψ_o^{100} in day 16th in Ac; in brackets the percentage of contribution of each solute.

| | | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | | |
|------------------|-------------|------------------------------|--------|-------|--------|------------------------------|--------|-------|---------|
| | | WW | | D | | WW | | D | |
| Ψ_o^{100} | Monoculture | -1.34 | | -1.30 | | -1.30 | | -1.14 | |
| | Mixture | -1.14 | | -1.41 | | -1.07 | | -1.29 | |
| K ⁺ | Monoculture | -0.60 | (44.8) | -0.60 | (46.2) | -0.65 | (49.8) | -0.58 | (50.6) |
| | Mixture | -0.53 | (46.4) | -0.72 | (50.7) | -0.59 | (54.8) | -0.81 | (62.8) |
| Ca ²⁺ | Monoculture | -0.04 | (3.3) | -0.05 | (3.8) | -0.05 | (4.0) | -0.05 | (4.7) |
| | Mixture | -0.04 | (3.7) | -0.06 | (4.3) | -0.04 | (3.8) | -0.07 | (5.3) |
| Mg ²⁺ | Monoculture | -0.07 | (5.3) | -0.08 | (5.8) | -0.09 | (6.7) | -0.08 | (6.7) |
| | Mixture | -0.07 | (6.0) | -0.09 | (6.0) | -0.06 | (6.1) | -0.10 | (7.6) |
| Inorganic | Monoculture | -0.72 | (53.9) | -0.74 | (57.0) | -0.80 | (61.2) | -0.72 | (63.3) |
| | Mixture | -0.65 | (57.0) | -0.88 | (62.5) | -0.70 | (65.8) | -1.00 | (77.4) |
| Sugars | Monoculture | -0.08 | (5.80) | -0.07 | (5.54) | -0.08 | (6.03) | -0.10 | (8.45) |
| | Mixture | -0.07 | (6.17) | -0.10 | (7.41) | -0.07 | (6.35) | -0.16 | (12.39) |
| Proline | Monoculture | -0.00 | (0.14) | -0.00 | (0.29) | -0.00 | (0.15) | -0.00 | (0.18) |
| | Mixture | -0.00 | (0.13) | -0.02 | (1.15) | -0.00 | (0.13) | -0.11 | (8.18) |
| Organics | Monoculture | -0.08 | (5.94) | -0.08 | (5.83) | -0.08 | (6.18) | -0.10 | (8.64) |
| | Mixture | -0.07 | (6.30) | -0.12 | (8.57) | -0.07 | (6.49) | -0.27 | (20.57) |
| Others | Monoculture | -0.54 | (40.1) | -0.48 | (37.2) | -0.42 | (32.6) | -0.24 | (28.1) |
| | Mixture | -0.42 | (36.7) | -0.41 | (28.9) | -0.30 | (27.7) | -0.03 | (2.0) |

4.2.6. Transpiration and hydraulic conductance in progressive drought

On day 9, the highest cumulative transpiration per pot was recorded in the monoculture of Tp, followed by the mixture (21% less) and finally by the monoculture of Ac, which was 60% lower than the monoculture of Tp (Fig. 4.9A). Under well-watered conditions, the elevated CO₂ increased the cumulative transpiration per pot, in the case of the monoculture of Tp, by 15%, but no differences were observed

either in the mixture or in the monoculture of Ac. After 9 days in water stress, at ambient CO₂, the cumulative transpiration per pot decreased in the monoculture of Tp by 16%, but no effect was observed either in the mixture or in the monoculture of Ac. At elevated CO₂, the reduction of the monoculture of Tp was higher (28%) and, as it happened at ambient CO₂, no differences were detected in the other treatments.

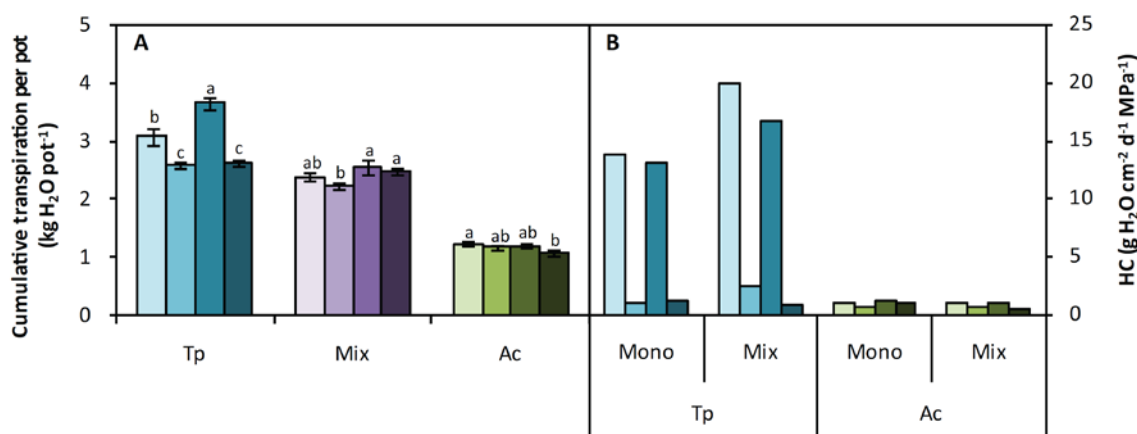


Fig. 4.9. Effects of drought, CO₂, and competition on cumulative transpiration per pot (A) and the transpiration per area and day (B) of the monoculture of Tp, the mixture, and the monoculture of Ac in day 9th. Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 4.2.

The hydraulic conductance (HC) was lower in Ac than in Tp in all treatments (Fig. 4.9B). Under well-watered conditions, the HC of Tp in mixture was higher than in monoculture, at ambient CO₂, as well as at elevated CO₂, while in Ac, the HC was higher in mixture only at ambient CO₂. The elevated CO₂, generally, reduced the HC of Tp, between 5% and 15% on day 9 under well-watered conditions; however, in Ac, elevated CO₂ increased HC between 7.5% and 13.5%. In drought conditions, the HC of Tp was reduced by *circa* 90% in both types of competition, regardless of the concentration of CO₂. In Ac, the decline in HC by drought was affected by the type of competition and the concentration of CO₂. Thus, in monoculture, the decrease was of 40% at ambient CO₂ and of 21% at elevated CO₂, and, in mixture, the reduction was of 34% and 64% at ambient and elevated CO₂, respectively.

4.2.7. Transpiration and hydraulic conductance in homogeneous drought

On day 16, the same pattern as on day 9, in the cumulative transpiration per pot was observed, *i.e.*, the monoculture of Tp presented the highest values, followed by the mixture, which was 19% lower, and the monoculture of Ac which was 60% lower (Fig. 4.10A). The elevated CO₂, in well-watered conditions, increased the cumulative transpiration per pot in the monoculture of Tp by 15%, but not significantly in the other treatments. Water stress at ambient CO₂ caused a decrease of 56% and 47% in the cumulative transpiration per pot, in the monoculture of Tp and the mixture, respectively. At elevated CO₂, the decline in cumulative transpiration per pot was higher, 62 and 53% for the monoculture of Tp and the mixture, respectively. However, in the monoculture of Ac no differences were observed under both concentrations of CO₂.

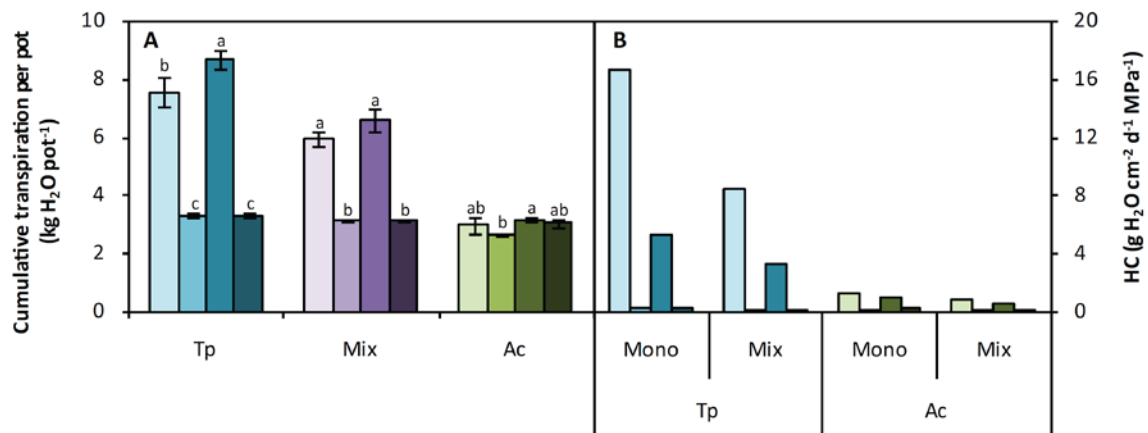


Fig. 4.10. Effects of drought, CO₂, and competition on cumulative transpiration per pot (A) and the transpiration per area and day (B) of the monoculture of Tp, the mixture, and the monoculture of Ac in day 16th. Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 4.2.

The HC decreased in both species under well-watered conditions the day 16 compared to day 9, except in the monocultures at ambient CO₂ (Fig. 4.10B). As it happened on day 9, on day 16, the HC was, generally, lower in Ac than in Tp in all treatments. The elevated CO₂ decreased HC under well-watered conditions, except in

the monoculture of Ac. Drought reduced HC in all treatments, most notably in Tp than in Ac. In the case of Tp, the water stress reduced the HC by about 95%, regardless of the type of competition and the concentration of CO₂. In Ac, the declines in monoculture were of 84% and 68% at ambient and elevated CO₂, respectively. In mixture, the drop in the HC of Ac was of 82%, regardless of the concentration of CO₂.

Table 4.5. Summary of ANOVA results (*P*-values) for the effects of CO₂ (ambient and elevated), competition (comp; monoculture and mixture), water (well-watered and drought), and species (Ac and Tp) and their interactions in the 9th day. Bold values indicate significance at *P*≤0.05.

| | <i>RSWC</i> | <i>RWC</i> | Ψ_{vpd} | Ψ_{wmd} | Ψ_{opd} | Ψ_{omd} | <i>Proline</i> | <i>Soluble sugars</i> |
|--------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|-----------------------|
| CO ₂ | 0.208 | 0.201 | 0.003 | 0.555 | 0.095 | 0.000 | 0.599 | 0.000 |
| Comp | 0.025 | 0.064 | 0.001 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.776 | 0.728 |
| Water | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.010 | 0.000 |
| Sp | 0.000 | 0.000 | 0.006 | 0.000 | 0.000 | 0.081 | 0.100 | 0.273 |
| CO ₂ xComp | 0.186 | 0.841 | 0.353 | 0.146 | 0.073 | 0.648 | 0.819 | 0.005 |
| CO ₂ xWater | | 0.111 | 0.062 | 0.653 | 0.088 | 0.230 | 0.532 | 0.000 |
| CO ₂ xSp | 0.828 | 0.783 | 0.819 | 0.056 | 0.004 | 0.003 | 0.662 | 0.001 |
| CompxWater | 0.000 | 0.006 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.002 | 0.797 | 0.016 |
| CompxSp | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.006 | 0.415 | 0.763 | 0.229 | 0.005 |
| WaterxSp | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.113 | 0.000 |
| CO ₂ xCompxWater | | 0.463 | 1.000 | 0.450 | 0.918 | 0.265 | 0.802 | 0.002 |
| CO ₂ xCompxSp | 0.828 | 0.280 | 0.400 | 0.756 | 0.814 | 0.262 | 0.195 | 0.001 |
| CO ₂ xWaterxSp | | 0.438 | 0.852 | 0.821 | 0.496 | 0.012 | 0.674 | 0.000 |
| CompxWaterxSp | | 0.000 | 0.000 | 0.002 | 0.005 | 0.005 | 0.207 | 0.089 |
| CO ₂ xCompxWaterxSp | | 0.222 | 0.391 | 0.732 | 0.494 | 0.957 | 0.202 | 0.005 |

Table 4.6. Summary of ANOVA results (P -values) for the effects of CO_2 (ambient and elevated), competition (comp; monoculture and mixture), water (well-watered and drought), and species (Ac and Tp) and their interactions in the 16th day. Bold values indicate significance at $P \leq 0.05$.

| | <i>RSWC</i> | <i>RWC</i> | Ψ_{vpd} | Ψ_{vmd} | Ψ_{opd} | Ψ_{omd} | <i>Proline</i> | <i>Soluble sugars</i> |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|-----------------------|
| CO_2 | 0.002 | 0.635 | 0.081 | 0.328 | 0.081 | 0.609 | 0.000 | 0.004 |
| Comp | 0.020 | 0.000 | 0.008 | 0.000 | 0.697 | 0.004 | 0.005 | 0.003 |
| Water | | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Sp | 0.213 | 0.000 | 0.188 | 0.097 | 0.710 | 0.337 | 0.000 | 0.006 |
| $\text{CO}_2 \times \text{Comp}$ | 0.951 | 0.666 | 0.250 | 0.051 | 0.502 | 0.661 | 0.061 | 0.938 |
| $\text{CO}_2 \times \text{Water}$ | | 0.380 | 0.038 | 0.563 | 0.022 | 0.079 | 0.000 | 0.017 |
| $\text{CO}_2 \times \text{Sp}$ | 0.174 | 0.572 | 0.141 | 0.566 | 0.313 | 0.090 | 0.040 | 0.808 |
| Comp \times Water | | 0.000 | 0.083 | 0.134 | 0.146 | 0.000 | 0.004 | 0.204 |
| Comp \times Sp | 0.213 | 0.000 | 0.000 | 0.018 | 0.299 | 0.037 | 0.007 | 0.058 |
| Water \times Sp | | 0.643 | 0.077 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.004 |
| $\text{CO}_2 \times \text{Comp} \times \text{Water}$ | | 0.981 | 0.347 | 0.280 | 0.033 | 0.315 | 0.060 | 0.904 |
| $\text{CO}_2 \times \text{Comp} \times \text{Sp}$ | 0.174 | 0.409 | 0.011 | 0.012 | 0.761 | 0.077 | 0.020 | 0.708 |
| $\text{CO}_2 \times \text{Water} \times \text{Sp}$ | | 0.783 | 0.093 | 0.687 | 0.704 | 0.926 | 0.040 | 0.020 |
| Comp \times Water \times Sp | | 0.000 | 0.000 | 0.423 | 0.011 | 0.005 | 0.006 | 0.128 |
| $\text{CO}_2 \times \text{Comp} \times \text{Water} \times \text{Sp}$ | | | | | | | | |
| Water \times Sp | | 0.091 | 0.009 | 0.059 | 0.150 | 0.163 | 0.020 | 0.342 |

4.3. Discussion

4.3.1. Effects of drought under ambient CO₂

In the experiment of progressive drought, soil water content is mainly determined by the consumption of water through plant transpiration (Fig. 4.9A), which ultimately depends on the transpiration per area (Fig. 4.9B) and leaf area (Fig. 7.1F) (Wullschleger et al., 2002). Transpiration per area is determined by the gradient of water potential in the soil-plant-atmosphere continuum and the water flow resistances within the whole plant. The monoculture of Ac was the treatment that presented the lower decrease in RSWC, followed by the mixture, being the monoculture of Tp the treatment that reduced the soil water content more. Thus, the smaller decrease in RSWC in the monoculture of Ac compared to the monoculture of Tp was due to the lower rates of transpiration, which were determined by the lower hydraulic conductance (Fig. 4.9B) as well as by the lower leaf area (Fig. 7.1F). In the case of the mixture, the total transpiration is a combination between total plant transpiration of Tp and Ac. The higher transpiration per area and leaf area of Tp in mixture with respect to monoculture, were offset by the lower transpiration per area and leaf area of Ac in mixture versus monoculture. As a result, the total transpiration of the mixture was intermediate between the monocultures of Ac and Tp (Fig. 4.9A) and, therefore, RSWC was intermediate (Fig. 4.1). In the homogeneous drought period, the soil volumetric water content was manipulated so all treatments presented the same soil water content (Fig. 4.1).

This decrease in RSWC results in a lower water uptake capacity for plants and, therefore, in a reduction in RWC (Fig. 4.2). However, to affect the RWC, the RSWC needs to decrease below a threshold value (Polley et al., 2012), which in this case would be about 30%, *i.e.*, the monoculture of Tp on day 9 and all treatments on day 16. On day 16, all treatments showed a similar RWC except Ac in monoculture, which showed higher values (Fig. 4.4). As the RWC is a balance between water uptake and loss, one would expect differences in any of these processes. Indeed, lower stomatal conductance was observed in Ac monoculture comparing with Tp (Fig. 5.1B). The difference in Ac

between plants grown in monoculture and in mixture was not due to differences in hydraulic or stomatal conductance, as both parameters were similar between treatments (Figs. 4.9B and 5.2B), but could be explained by the lower water uptake capacity of Ac in mixture caused by the competition of Tp, as the root biomass of Tp was much higher than the one of Ac (Fig. 7.1E).

As noted previously, to avoid a massive fall in RWC, the plant can, on one hand, avoid the decrease in water uptake and, on the other hand, minimize water loss through transpiration.

To maintain the water uptake, the plant diminishes its water potential (Pérez-López et al., 2009a). One of the mechanisms of plants to achieve this goal is to lower the osmotic potential. Several authors have argued that the plant reduces its osmotic potential only when the plant survival is at risk (Serraj & Sinclair, 2002), which concurs with these results, since a decrease in osmotic potential was only observed in the treatments more affected by drought, *i.e.*, on day 9 in the monoculture of Tp and on day 16 in Tp in both types of competition and in Ac in mixture (Figs. 4.3D and 4.5D).

This decrease in osmotic potential can be caused by dehydration (having less water in the cells provokes the concentration of solutes to rise) or by active synthesis of osmolytes, what is known as osmotic adjustment (Tables 4.1 and 4.3). In the monoculture of Tp on the day 9, the decrease in osmotic potential was mainly due to dehydration, although there were osmotic adjustment, through an increase in the synthesis of sugars (Fig. 4.6A) and proline (Fig. 4.6B). On day 16, in Tp in both types of competition, the decrease in osmotic potential was due to both factors. On one hand, Tp induced the synthesis of compatible osmolytes (proline and sugars), in both types of competitive and, on the other hand, the concentration of osmolytes also increased through a concentration effect by dehydration; the effect of dehydration was approximately twice of the active synthesis of osmolytes (Table 4.3). This would indicate that the development in competition with Ac does not affect the water status of Tp when the soil water content is similar between treatments. In the case of Ac in mixture on the 16 day, the decrease in osmotic potential was also due to passive dehydration and osmotic adjustment (mainly through the synthesis of proline). In Ac,

osmotic adjustment was observed only when the RWC decreased below 75%, however, other authors observed osmotic adjustment in plants of the genus *Agrostis* despite the RWC decreased only to 90% (DaCosta & Huang, 2006).

Other authors have also demonstrated the synthesis of proline and sugars as compatible molecules in grassland species: Iannucci et al. (2002) and Lee et al. (2008) in clover and DaCosta & Huang (2006) in plants of the genus *Agrostis*. Other compounds such as γ -aminobutyric acid, polyamines (De Diego et al., 2013), glycinebetaine (Bajji et al., 2001; Silva et al., 2010), and various polyalcohols such as mannitol or sorbitol (Bohnert et al., 1995) have also been proposed as possible organic compounds that plant synthesizes for osmotic adjustment, so it can not be ruled out that the contribution of organic compounds was higher than the one detected, and in this case it would be encompassed in the component called "other solutes" (Table 4.4).

The decrease in the osmotic potential allowed the plant to reduce the water potential to maintain the water uptake. However, in all cases that the passive dehydration was involved as a mechanism for lowering the osmotic potential, the turgor potential was reduced due to the lower water content in the cells.

To evade the dehydration and prevent the decrease in turgor potential, the plant alters the cell wall elasticity, making it more elastic (Kozlowski et al., 1991). However, there have also been cases where plant increases the rigidity of the cell wall to reduce water potential with a minimum loss of water content in the plant and, thus, maintain the water uptake (Kozlowski et al., 1991; Touchette et al., 2007). Both processes are considered advantageous for the plant (Schulte, 1992; Saito & Terashima, 2004). The rigidity of the cell wall followed different trends depending on the species and type of competition. In Tp, in both types of competition, differences were observed depending on the period of drought, on day 9 there was a slight decrease in ϵ (Table 4.1), *i.e.*, there was an increase in the elasticity of the cell wall. However, on day 16, the ϵ increased significantly (Table 4.3), which would imply a change in strategy. For a short period of drought or a mild drought, Tp seeks to maintain its turgidity to maintain growth; however, after a longer period of drought and a more severe drought, Tp tries to maintain the water uptake at the expense of reducing the turgor (Fig. 4.5F). Conversely,

Ac has an opposite tendency to Tp, *i.e.*, when the drought is severe decreases ϵ and most notably in mixture than in monoculture, where the water status of Ac was most affected. However, in monoculture, although it had not seen a high dehydration, the turgor potential was reduced to values close to 0 on day 16. This could be caused by the high rigidity of the cell wall (despite decreased its rigidity in drought) that implies that a small change in the RWC translates into a high decrease in turgor potential, although the value of RWC was up to 90%.

These facts confirm what it is seen in the literature, *i.e.*, the response of the cell wall elasticity to drought is species-specific, showing increases as well as decreases in grassland species (Barker et al., 1993; Chai et al., 2010). The variation in the volumetric elasticity modulus in drought has been associated, among other factors, to changes in the components of the cell wall, the appearance of cell wall proteins and the boron concentration (Findelee & Goldbach, 1996; Marshall & Dumbroff, 1999). A correlation with boron was not detected in neither species ($r^2 = 0.009$ in grasses; $r^2 = 0.020$ in legumes); however, a negative correlation with the concentration of hemicellulose was observed (Fig. 4.7), *i.e.*, the higher the concentration of hemicellulose the higher the cell wall elasticity, confirming that changes in the composition of the cell wall could be responsible to the change in the elasticity of the cell wall.

Additionally, to minimize water loss by transpiration, plants reduced the hydraulic conductance (Figs. 4.9B and 4.10B) and/or leaf area (Figs. 7.1F and 7.2F). Various causes have been described of the change in hydraulic conductance, including stomatal closure, the change in activity of aquaporins, and cavitation (Tyree & Sperry, 1989; Steudle & Henzler, 1995; Cochard et al., 2002; Kaldenhoff et al., 2008). In general, in nearly all treatments, the percentage reduction in stomatal conductance (Figs. 5.1B and 5.2B) was lower than the decrease in hydraulic conductance (Figs. 4.9B and 4.10B), therefore, the presence of other mechanisms such as those mentioned above, can not be ruled out for these species. In Ac in mixture, however, the percentage of the decrease in hydraulic conductance was similar to the one in stomatal conductance, indicating that the decrease in stomatal conductance would be the main cause of reduction of the hydraulic conductance in that treatment. Although all treatments showed a general

downward trend in hydraulic conductance, not all treatments declined by the same magnitude; the treatments more affected by drought were the ones with the higher reduction in hydraulic conductance.

4.3.2. Effects of drought under elevated CO₂

In the period of progressive drought at elevated CO₂ there was no difference in RSWC in the monocultures comparing to ambient CO₂ (Fig. 4.1), since as pointed by Samarakoon & Gifford (1995), transpiration at elevated CO₂ will not be modified if the decrease in stomatal conductance is offset by greater leaf area. Several authors have also highlighted this fact (Picon et al., 1996; Centritto et al., 1999a; Ellsworth, 1999; Nowak et al., 2004b). This would cause that differences in RWC in both species were neither found (Fig. 4.2) nor in the water potential of Tp (Fig. 4.3B), comparing with the values obtained at ambient CO₂. However, in both species the turgor potential presented higher values at elevated CO₂ than at ambient CO₂ (Fig. 4.3F). Turgor maintenance is considered essential to maintain normal cellular activity and growth (Martínez et al., 2007), therefore, the elevated CO₂ would benefit these species under drought conditions. The mechanism is different between species. Thus, in the case of Tp, the higher turgor potential was caused by the higher decrease in osmotic potential at elevated CO₂ (Fig. 4.3D), as a consequence of higher osmotic adjustment (Table 4.1) and more elastic cell walls (Table 4.1).

Several authors have reported that, at elevated CO₂, the plant would present greater osmotic adjustment due to the increased availability of carbon skeletons, as a result of the higher photosynthetic rates at elevated CO₂ than at ambient CO₂ in drought conditions (Morse et al., 1993; Ferris & Taylor, 1994; Wall et al., 2006; Chen et al., 2015), as is the case in the monoculture of Tp (Figs. 5.1A and 5.2A), which permitted to increase the synthesis of sugars and proline (Fig. 4.6).

However, other authors have not observed differences in osmotic adjustment, despite having higher photosynthetic rates at elevated CO₂ (Tschaplinski et al., 1995a, b; Robredo et al., 2007), as is the case in the monoculture of Ac (Table 4.1). Conversely, Ac, thanks to its higher stomatal closure (Fig. 5.2B), had a lower water loss and was able to maintain a higher RWC and, therefore, a lower dehydration. This would imply that the turgor potential was higher, since the cell walls had a high rigidity and therefore a small increase in the RWC results in an increase in turgor potential (Saito & Terashima, 2004).

In mixture, in contrast, in the period of progressive drought, the leaf area increased more than the reduction in transpiration per area in response to elevated CO₂, so total transpiration was greater and the soil water content decreased more than at ambient environmental CO₂ (Fig. 4.1), as also was observed by Fredeen et al. (1998) and Tricker et al. (2009).

This different behavior of the mixture at elevated CO₂ in the soil water content resulted in a decrease in the leaf water content in both species (Fig. 4.2) and in a reduction in water potential (Fig. 4.3B), not observed at ambient CO₂.

This reduction in water potential was due exclusively to a decrease in osmotic potential in the case of Tp, being the osmotic adjustment responsible for approximately 33% of this reduction (increased contribution of sugars) and the remainder by passive dehydration (Table 4.1). In mixture, the osmotic adjustment allowed Tp to maintain its turgor potential constant.

In Ac in mixture, the water potential drop was due to the lower turgor potential compared to plants grown under well-watered conditions; however, the turgor potential showed similar values at elevated CO₂ than at ambient CO₂. Despite having a lower RWC than at ambient CO₂, the plant was able to maintain turgor potential at similar values that at ambient CO₂, thanks to adjust the elasticity of its cell wall.

On day 16, all treatments presented the same soil volumetric water content; therefore, there were no differences between CO₂ treatments in the RSWC. Consequently, no differences in the RWC were detected (Fig. 4.4).

Differences in water potential were neither found between CO₂ treatments (Fig. 4.5B) except in the monoculture of Ac, where the water potential was less negative at elevated CO₂ because the turgor potential was higher at elevated CO₂. This difference in turgor potential might be due to the high rigidity of the cell wall, so a small change in the RWC affects the turgor potential and although the difference in RWC between CO₂ concentrations was not statistically significant, the small increase in RWC allowed the plant to have a higher turgor potential. The greater RWC might be explained, on one hand, by the lower stomatal conductance recorded at elevated CO₂ compared to ambient CO₂ (Fig. 5.2B), permitting a lower water loss than at ambient CO₂, and, on the other hand, by the higher hydraulic conductance (Fig. 4.10B), which was twice at elevated CO₂ than at ambient CO₂, which would allow the plant to uptake more water.

Although elevated CO₂ did not affect the water potential of Tp, the elevated CO₂ partially mitigated the negative effect of drought on the turgor potential of Tp in both types of competition (Fig. 4.5F), thanks to the increased elasticity of the cell wall compared to the one obtained at ambient CO₂ (Table 4.3). An elastic cell wall allows the plant a higher turgor potential for the same loss of water content (Saito & Terashima, 2004). As mentioned above, the elasticity of the cell wall appears to be associated with a higher content of hemicellulose, and elevated CO₂ caused a higher concentration of hemicellulose in Tp (Table 7.10).

In addition, there were other mechanisms in Tp dependent on the type of competition that enabled the plant to present a greater turgor potential. In monoculture, as was also observed on day 9, higher osmotic adjustment was found at elevated CO₂ than at ambient CO₂ (Table 4.3) due to the greater availability of carbon skeletons allocated to the synthesis of proline and sugars. The higher decrease in the osmotic potential enabled the plant to maintain a higher turgor potential.

In the treatment of mixture, due to the greater difference between Tp and Ac root biomass at elevated CO₂ than at ambient CO₂ (Fig. 7.2E) and the higher hydraulic conductance of Tp than the one of Ac (Fig. 4.10B), the water uptake of Tp was higher than the one of Ac, which also allowed Tp to maintain a higher turgor potential.

This increased capacity of water uptake of Tp in mixture provoked that Ac was more affected at elevated CO₂ than at ambient CO₂, as shown by its lower turgor potential and that the osmotic potential decrease was mainly due to dehydration.

4.4. Conclusions

- When plants were subjected to nine days of water deficit, only Tp in monoculture was affected due to the higher soil water conservation of the other treatments.
- On day 16, when all treatments had the same soil water content, the monoculture of Ac was less affected by water deficit by its smaller water loss compared to Tp and its higher water uptake than Ac in mixture.
- The mechanism of drought tolerance varied among species. Tp presented osmotic adjustment, increasing the proline and sugars synthesis, and, when the drought was more severe, also increased the rigidity of the cell wall. Ac, instead, increased elasticity of the cell wall against drought.
- The elevated CO₂ alleviated the water status of Tp in both types of competition and the one of Ac in monoculture.
- The elevated CO₂ improved the water status of Tp in both types of competition through greater elasticity of the cell wall and in monoculture also due to an increase in osmotic adjustment, and not by greater soil water conservation. The elevated CO₂ permit Ac to reduce water loss due to reduced stomatal conductance, which resulted in higher leaf water content.
- When the soil water content in monoculture was similar to the one in mixture, the type of competition did not affect the water status of Tp in both CO₂ concentrations.
- The competition with Tp provoked that Ac was more affected by drought in mixture than in monoculture, due to the higher water uptake of Tp compare to Ac.

- The osmotic potential drop was due more to dehydration than to osmotic adjustment.
- The elastic adjustment was associated with hemicellulose concentration, the higher the concentration of hemicellulose the higher the elasticity of the cell wall.

5. Metabolismo fotosintético

5.1. Introducción

La vida en la tierra depende de la energía derivada del sol, ya que la fotosíntesis es el único proceso biológico importante que puede utilizar la energía solar (Taiz & Zeiger, 2010). Se estima que aproximadamente 200 mil millones de toneladas de CO₂ son convertidas en biomasa cada año a través de la fotosíntesis. La fotosíntesis comprende desde la captación de la energía por los pigmentos fotosintéticos y su conversión en energía química en forma de NADPH y ATP, hasta la utilización de estos productos por la enzima Rubisco en la fijación del CO₂ absorbido a través de los estomas.

La energía solar es captada en los cloroplastos de las hojas por los pigmentos fotosintéticos que se sitúan en los complejos antena. Los principales pigmentos fotosintéticos son las clorofilas *a* y *b*, aunque los carotenoides también son capaces de captar la energía solar y transmitirla a las clorofilas, llamándose por ello, pigmentos accesorios. Existen dos complejos antena (LHCI y LHCII) cada uno situado en un fotosistema (PSI y PSII) que captan la energía y la canalizan a los respectivos centros de reacción de los fotosistemas con una eficiencia del 95%, a través del mecanismo denominado transferencia por resonancia (Pullerits & Sundström, 1996).

Los fotones canalizados por el complejo antena excitan una clorofila especializada del centro de reacción del PSII que, a través de una serie de reacciones de oxido-reducción, transporta el electrón obtenido por la fotólisis del agua al PSI donde se reduce el NADP⁺ a NADPH. El paso del electrón a través del citocromo b₆f, que está situado en la membrana de los tilacoides, junto con la propia lisis del agua, permite la generación de un gradiente de protones en el lumen que, en último término, será aprovechado por una ATPasa para la generación de ATP.

Estos dos productos de la fase lumínica de la fotosíntesis (NADPH y ATP) son utilizados en el ciclo de Calvin para obtener triosas fosfato, una sexta parte de las cuales se utilizan para la síntesis de azúcares, y el resto, cinco sextas partes, son utilizadas para la regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP), que es la molécula donde la Rubisco fija el CO₂. La energía almacenada en los fotoasimilados puede ser usada posteriormente para diversos procesos celulares como el crecimiento, estructuras de reserva y/o compuestos antioxidantes.

El aumento de la concentración externa de CO₂, a pesar de provocar un cierre estomático (Ainsworth & Long, 2005), permite una mayor difusión de CO₂ a los cloroplastos con lo que la Rubisco dispondría de mayor cantidad de sustrato. La presente concentración no satura a la Rubisco, por lo que la fotosíntesis de las plantas C₃ respondería positivamente al aumento del CO₂ (Lawlor & Keys, 1993; Drake et al., 1997). Además, el ciclo oxidativo del carbono (fotorrespiración) está inhibido por los mayores niveles de CO₂ (Pérez-López et al., 2012). El elevado CO₂, por tanto, reduce las limitaciones de difusión necesaria para la fotosíntesis, incrementa la carboxilación y reduce la actividad oxigenasa de la Rubisco (Sage, 1994). La mayor tasa de fotosíntesis observada induce una mayor síntesis de azúcares y, por tanto, los niveles de azúcares de reserva como el almidón tienden a aumentar (Goverde et al., 2002; De la Mata et al., 2012; Pérez-López et al., 2012).

Bajo condiciones de disponibilidad hídrica limitada, el metabolismo fotosintético se ve seriamente comprometido, tanto a nivel de intercambio gaseoso, como a nivel fotoquímico y bioquímico (Chaves et al., 2003, Raven et al., 2004, Robredo et al., 2007). Como se ha mencionado en el anterior capítulo, una de las primeras respuestas de las plantas a la sequía es el cierre estomático para reducir la pérdida de agua por transpiración (Liu & Stützel, 2002). Este cierre estomático reduce la disponibilidad de CO₂ en los cloroplastos, lo que conlleva una reducción de la fotosíntesis (Cornic & Massacci, 1996; Cornic, 2000; Robredo et al., 2007), al mismo tiempo que se incrementarían las tasas de fotorrespiración (Renou et al., 1990; Noctor et al., 2002; Galmés et al., 2007). En condiciones de sequía, el cierre estomático se considera el principal factor limitante de la fotosíntesis, si bien, al incrementarse la intensidad de la

sequía pueden aparecer también limitaciones bioquímicas y fotoquímicas (Tezara et al., 1999; Flexas et al., 2002; Lawlor & Cornic 2002; Peña-Rojas et al., 2004).

Cuando las plantas crecen bajo condiciones combinadas de sequía y elevado CO₂, algunas de las restricciones impuestas por la sequía se ven mitigadas (Lawlor & Cornic, 2002; Robredo et al., 2007; 2010). La mayor concentración externa de CO₂ permite que para una misma conductancia estomática la cantidad disponible de CO₂ en los cloroplastos sea mayor y, por tanto, se reduzca la limitación difusional provocada por la sequía (Lawlor & Cornic, 2002; Robredo et al., 2007). Algunos estudios aseguran que también las limitaciones bioquímicas y fotoquímicas, impuestas por la sequía a CO₂ ambiental, se ven reducidas cuando las plantas crecen a elevado CO₂ (Robredo et al., 2010).

El efecto tanto de la sequía como del elevado CO₂ varía entre especies. Así, von Caemmerer et al. (2001) encontraron incrementos de la tasa fotosintética de un 6-8% para especies de tréboles y de un 40% en *Lolium perenne* en condiciones de elevado CO₂ con respecto a CO₂ ambiental en condiciones de buen aporte hídrico; Ainsworth & Long (2005) también observaron resultados similares en su revisión, estableciendo que, por término medio, las leguminosas aumentaban aproximadamente un 22% su asimilación de CO₂ y las gramíneas un 37%. Ainsworth & Rogers (2007) establecieron que la menor estimulación de la fotosíntesis en leguminosas con respecto a las gramíneas a elevado CO₂ se debía a que la regeneración de la RuBP limita la fotosíntesis a elevado CO₂ en las leguminosas.

AbdElgawad et al. (2015) detectaron que las dicotiledóneas vieron más afectada por la sequía su tasa fotosintética que las gramíneas. Además de estas diferencias intrínsecas entre especies, cuando las plantas crecen junto a otras especies, el diferente desarrollo de cada una puede provocar diferente capacidad competitiva para obtener los recursos necesarios para una correcta asimilación de CO₂. Zhang et al. (2008) en estudios con *Trifolium pratense* y *Festuca rubra* postularon que cuando las plantas crecen en mezcla la competencia por la luz resulta determinante para determinar la capacidad fotosintética.

El objetivo general de este capítulo es determinar el efecto de la sequía, el elevado CO₂ y la competencia sobre el metabolismo fotosintético de *Agrostis capillaris* y *Trifolium pratense*. Para ello se ha dividido este objetivo en cinco objetivos parciales:

- Conocer el efecto que tiene el aumento de la concentración de CO₂ en el metabolismo fotosintético de dos especies pratenses bajo buen aporte hídrico.
- Estudiar el impacto de la sequía sobre el metabolismo fotosintético y determinar si existen diferencias en el efecto sobre ambas especies cuando son sometidas a un mismo periodo de sequía (sequía progresiva).
- Examinar el metabolismo fotosintético y las posibles diferencias sobre las dos especies cuando el nivel de sequía es idéntico en todos los tratamientos (sequía homogénea).
- Determinar la posible interacción entre la sequía y el aumento de la concentración de CO₂ en el metabolismo fotosintético.
- Analizar el papel que juega el tipo de competencia al que son sometidas ambas especies en la respuesta fotosintética de las especies al aumento del CO₂, la sequía y su interacción.

Con estos objetivos, las hipótesis de partida son: 1) el elevado CO₂ aumentará la asimilación de CO₂ gracias a la mayor entrada de CO₂ en los cloroplastos y a la menor fotorrespiración, siendo la gramínea Ac, la especie que se verá más beneficiada. 2) La sequía reducirá la tasa fotosintética por una limitación estomática en el periodo de sequía progresiva y, cuando la sequía sea más severa (sequía homogénea), también existirán limitaciones bioquímicas y fotoquímicas. 3) En el periodo de sequía progresiva, Tp se verá más afectada que Ac por la mayor transpiración de Tp que disminuye más el contenido de agua en el suelo. En el periodo de sequía homogénea ambas especies se verán afectadas de manera similar. 4) En condiciones combinadas de elevado CO₂ y sequía, la tasa fotosintética será mayor que la obtenida a CO₂ ambiental, gracias a la mayor entrada de CO₂. 5) El crecimiento en mezcla perjudicará a Ac cuando crezca en sequía debido a su menor capacidad competitiva con respecto a Tp para captar agua, por lo que presentará mayores limitaciones, tanto estomáticas como bioquímicas y fotoquímicas.

5.2. Resultados

5.2.1. Intercambio gaseoso en sequía progresiva

La tasa de asimilación de CO₂ (*A*) fue superior en Tp que en Ac, un 37% en monocultivo y un 80% en mezcla, independientemente de la concentración de CO₂, en condiciones de buen aporte hídrico (Fig. 5.1A; Tabla 5.3). En Tp no se observaron diferencias entre los tratamientos de competencia en condiciones de buen aporte hídrico, mientras que en Ac la *A* fue un 25% inferior en mezcla que en monocultivo, cualquiera que fuera la concentración de CO₂. En condiciones de buen aporte hídrico, el aumento de la concentración de CO₂ aumentó la *A* un 25% en ambas especies, cualquiera que fuera el tipo de competencia. En Tp a CO₂ ambiental, tras 9 días de sequía, la *A* se redujo un 27% en monocultivo, pero en mezcla no se detectaron diferencias significativas. A elevado CO₂, el descenso provocado por la sequía en monocultivo fue ligeramente menor (25%), mientras que en mezcla la *A* cayó un 12%. En Ac la sequía sólo provocó diferencias significativas en mezcla a elevado CO₂, donde la *A* se redujo un 61% con respecto a plantas crecidas a elevado CO₂ bajo buen aporte hídrico.

La conductancia estomática (*gs*) presentó valores superiores en Tp que en Ac, un 74% en monocultivo y un 130% en mezcla, cualquiera que fuera la concentración de CO₂ (Fig. 5.1B; Tabla 5.3). En Tp no se observaron diferencias significativas entre el monocultivo y la mezcla en condiciones de buen aporte hídrico; sin embargo, en Ac, la *gs* fue un 20% inferior en mezcla que en monocultivo. En condiciones de buen aporte hídrico, el elevado CO₂ disminuyó la *gs* aproximadamente un 35% en ambas especies, independientemente del tipo de competencia. En Tp bajo CO₂ ambiental, la sequía provocó un descenso de la *gs* de un 68% en monocultivo y de un 44% en mezcla. A elevado CO₂ el descenso en monocultivo fue del 77% y en mezcla del 70%. En Ac, la sequía sólo provocó diferencias significativas en mezcla, disminuyendo la *gs* un 32% a CO₂ ambiental y un 74% a elevado CO₂.

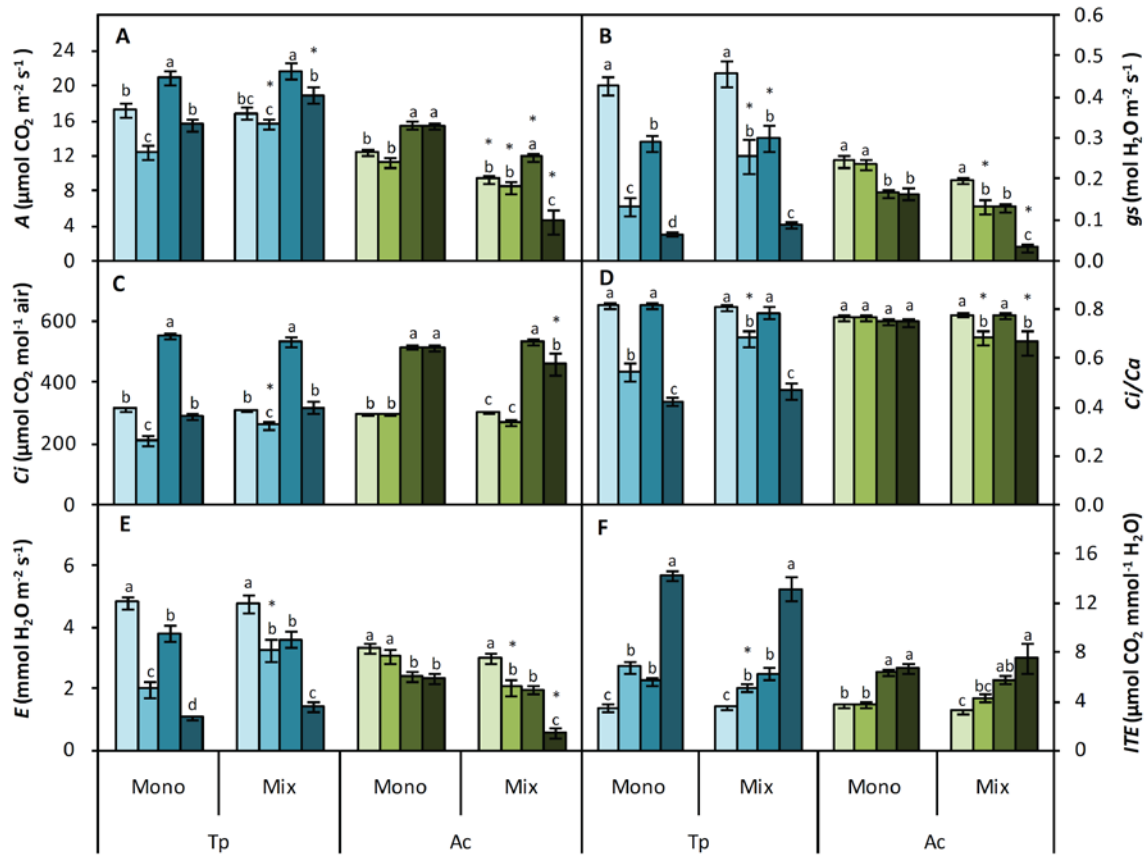


Fig. 5.1. Effects of drought, CO₂, and competition on CO₂ assimilation rate (A; A), stomatal conductance (gs; B), intercellular CO₂ concentration (Ci; C), Ci/Ca ratio (Ci/Ca; D), instantaneous transpiration rate (E; E), and instantaneous transpiration efficiency (ITE; F) in day 9th. Lightest bars represent well-watered plants at ambient CO₂, light bars represent drought plants at ambient CO₂, dark bars represent well-watered plants at elevated CO₂, and darkest bars represent drought plants at elevated CO₂. Tp denotes *Trifolium pratense*; Ac, *Agrostis capillaris*; Mono, monoculture; Mix, mixture. Different letters indicate significant differences at P < 0.05 within the same species and type of competition. * indicates differences within the same species between monoculture and mixture.

En condiciones de buen aporte hídrico, la concentración intercelular de CO₂ (Ci) no presentó diferencias entre especies ni entre los tratamientos de competencia (Fig. 5.1C; Tabla 5.3). El incremento de la concentración externa de CO₂ provocó un aumento de la Ci de aproximadamente un 70% en ambas especies y tipos de competencia en condiciones de buen aporte hídrico; sin embargo, si analizamos el cociente Ci/Ca, no se observaron diferencias entre concentraciones de CO₂ (Fig. 5.1D). En Tp, la sequía disminuyó la Ci y el cociente Ci/Ca un 32% en monocultivo y un 15%

en mezcla a CO₂ ambiental, mientras que a elevado CO₂ los descensos fueron mayores, del 47% y del 39% en monocultivo y mezcla, respectivamente. En Ac, la sequía sólo redujo significativamente la *C_i* y el cociente *C_i/C_a* en mezcla a elevado CO₂, cayendo ambos un 13%.

En la tasa de transpiración instantánea (*E*) se observaron diferencias entre especies en condiciones de buen aporte hídrico. Concretamente, a CO₂ ambiental, la *E* de Tp fue un 45% superior en monocultivo que la de Ac y un 60% mayor en mezcla, mientras que a elevado CO₂ las diferencias fueron superiores, del 60% y 82%, en monocultivo y mezcla, respectivamente (Fig. 5.1E; Tabla 5.3). El elevado CO₂ redujo la *E* en condiciones de buen aporte hídrico un 20% en monocultivo y un 25% en mezcla en el caso de Tp, mientras que en Ac los descensos fueron del 28% y 35%, respectivamente. En Tp, la sequía disminuyó la *E* un 58% en monocultivo y un 32% en mezcla a CO₂ ambiental, mientras que a elevado CO₂ los descensos fueron del 71% y del 60% en monocultivo y mezcla, respectivamente. En Ac la sequía sólo redujo la *E* significativamente en mezcla, un 30% a CO₂ ambiental y un 70% a elevado CO₂.

La eficiencia instantánea en el uso del agua (*ITE*) fue similar entre Tp y Ac y tampoco se observaron diferencias provocadas por la competencia en condiciones de buen aporte hídrico (Fig. 5.1F; Tabla 5.3). El elevado CO₂ provocó en las plantas en condiciones de buen aporte hídrico un incremento de la *ITE*, en Tp del 63% y 75% y en Ac del 75% y 82%, en monocultivo y mezcla, respectivamente. La sequía, en condiciones de CO₂ ambiental, aumentó la *ITE* de Tp un 96% en monocultivo y un 43% en mezcla. A elevado CO₂, los incrementos provocados por la sequía fueron superiores, del 153% en monocultivo y del 110% en mezcla. En Ac, la sequía sólo provocó diferencias (no significativas) en mezcla, donde incrementó la *ITE* un 35% a CO₂ ambiental y un 30% a elevado CO₂ con respecto a plantas crecidas bajo buen aporte hídrico en cada concentración de CO₂.

5.2.2. Intercambio gaseoso en sequía homogénea

Cuando las plantas crecieron bajo buen aporte hídrico, tal y como ocurrió en el día 9, la *A* fue superior en *Tp* que en *Ac*, un 30% en monocultivo, cualquiera que fuera la concentración de CO_2 , mientras que en mezcla fue dependiente de la concentración de CO_2 , un 85% y un 56% a CO_2 ambiental y elevado, respectivamente (Fig. 5.2A; Tabla 5.4). En *Tp* no se observaron diferencias entre las plantas que crecieron en monocultivo y las que crecieron en mezcla en condiciones de buen aporte hídrico, independientemente de la concentración de CO_2 . Sin embargo, en *Ac*, la *A* de las plantas en mezcla fue un 25% inferior que en monocultivo a CO_2 ambiental y un 15% a CO_2 elevado. En general, el incremento de la *A* por el aumento de la concentración de CO_2 fue menor en el día 16 que en el día 9, concretamente, un 14% en *Tp*, independientemente del tipo de competencia, y, en *Ac*, un 17% en monocultivo y un 35% en mezcla; sin embargo, los valores registrados a elevado CO_2 fueron similares en ambas especies los dos días. La sequía a CO_2 ambiental redujo la *A* de *Tp* un 38% en monocultivo y un 34% en mezcla. A elevado CO_2 los descensos fueron menores, del 34% y del 30% para el monocultivo y la mezcla, respectivamente. En el caso de *Ac*, la sequía bajo CO_2 ambiental provocó un descenso del 65% y del 71% en monocultivo y mezcla, respectivamente. El elevado CO_2 mitigó el efecto negativo de la sequía en monocultivo, disminuyendo la *A* un 25%, pero exacerbó el efecto en mezcla, cayendo la *A* un 90%.

En condiciones de buen aporte hídrico y a CO_2 ambiental, la *g_s* fue superior en *Tp* que en *Ac*, en función del tipo de competencia, un 41% en monocultivo y un 110% en mezcla; mientras que a CO_2 elevado la diferencia fue independiente del tipo de competencia, aproximadamente un 60% (Fig. 5.2B; Tabla 5.4). Por tanto, el tipo de competencia afectó a la *g_s* a CO_2 ambiental; así, *Tp* presentó valores mayores en mezcla que en monocultivo (24%); mientras que en *Ac* se observó la tendencia opuesta, es decir, en mezcla los valores fueron un 17% inferiores que en monocultivo. En condiciones de buen aporte hídrico, el elevado CO_2 disminuyó la *g_s* aproximadamente un 40% en ambas especies, independientemente del tipo de competencia. La sequía a CO_2 ambiental provocó un descenso de la *g_s* de *Tp* de un 68% en monocultivo y de un 75% en mezcla. A elevado CO_2 la caída fue del 76%, en ambos tipos de competencia.

En Ac la sequía provocó un descenso de la g_s a CO_2 ambiental del 83% independientemente del tipo de competencia. A elevado CO_2 la caída de la g_s fue mitigada en monocultivo (55%), pero no en mezcla (83%).

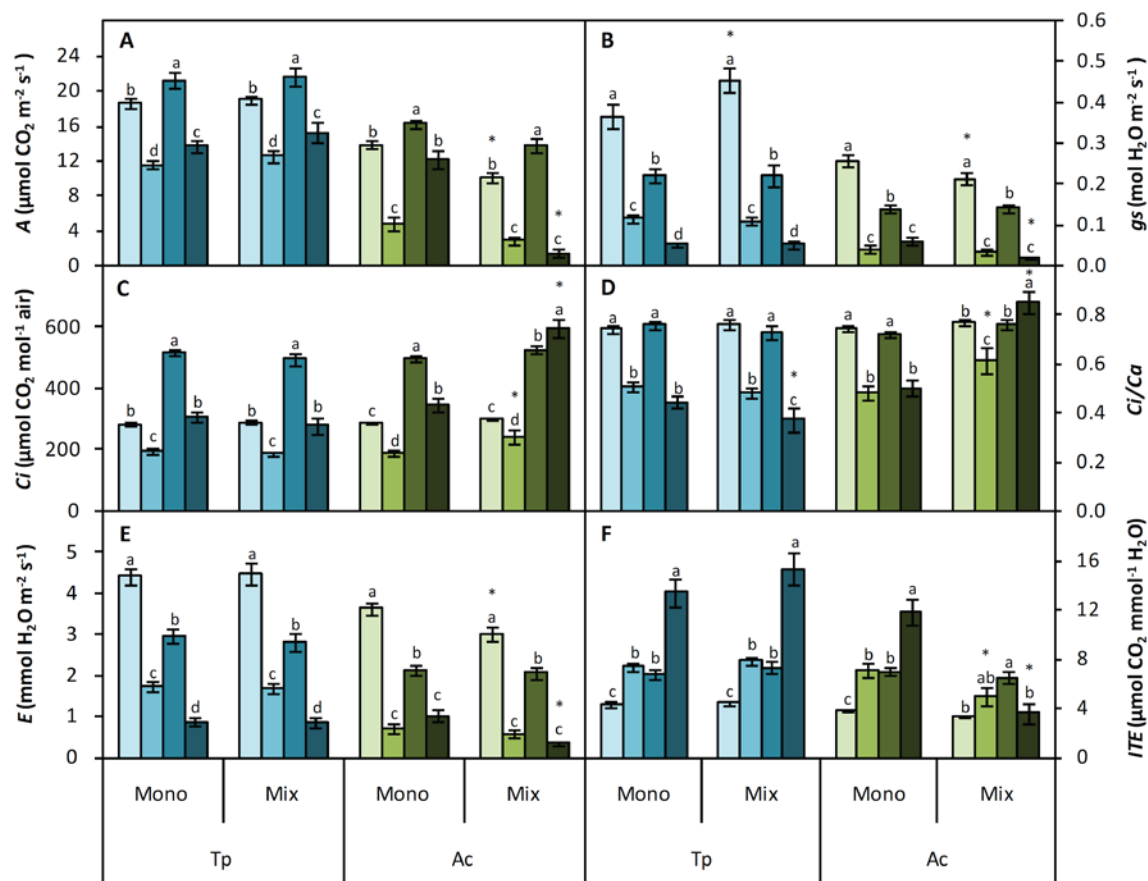


Fig. 5.2. Effects of drought, CO_2 , and competition on CO_2 assimilation rate (A; A), stomatal conductance (g_s ; B), intercellular CO_2 concentration (C_i ; C), C_i/C_a ratio (C_i/C_a ; D), instantaneous transpiration rate (E; E), and instantaneous transpiration efficiency (ITE; F) in day 16th. Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 5.1.

Cuando se analizaron conjuntamente los datos obtenidos en el periodo de sequía progresiva y los de sequía homogénea, se observó que la A se correlacionaba con el potencial hídrico foliar a mediodía (Ψ_{wmd}); a medida que el Ψ_{wmd} fue haciéndose más negativo el valor de la A fue disminuyendo (Figs. 5.3A y 5.4A). Esta relación no fue dependiente de la concentración de CO_2 en ninguna de las especies, deduciéndose del hecho de que las pendientes no fueron significativamente diferentes entre las distintas

concentraciones de CO₂. En el caso de Tp, a pesar de no afectar el CO₂ a la pendiente de la recta, sí se observó que para un mismo valor de Ψ_{wmd} el valor de *A* fue mayor.

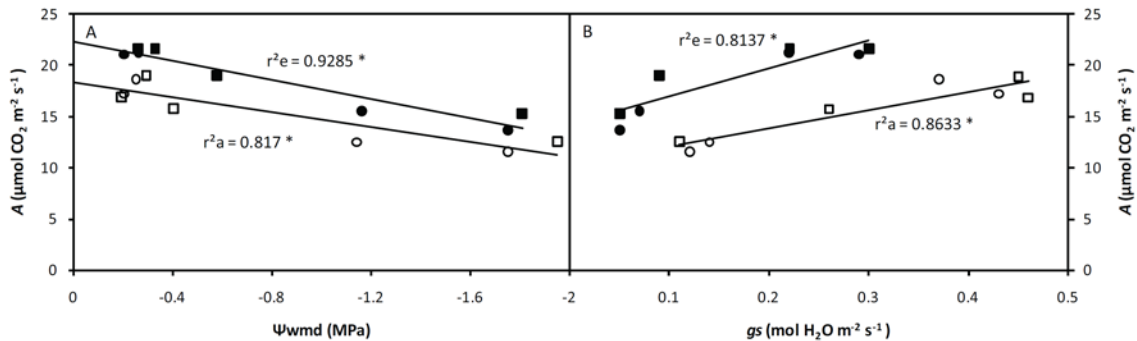


Fig. 5.3. Relationship for CO₂ assimilation rate (*A*) with leaf midday water potential (Ψ_{wmd}) (A) and stomatal conductance (*gs*) (B) in Tp plants grown at ambient (a, open symbols) or elevated (e, closed symbols) CO₂ concentration. Circles for plants grown in monoculture and squares for plants grown in mixture. No significant differences between CO₂ concentration were observed for (A) $F_{1,12} = 1.423$, $P = 0.256$ and (B) $F_{1,12} = 2.83$, $P = 0.115$. The symbols used *, **, *** indicate significant correlation at 5%, 1% and 0.1%, respectively.

Además de la anterior correlación también se encontró una correlación positiva entre la *A* y la *gs* en ambas especies (Figs. 5.3B y 5.4B). Dicha correlación no fue dependiente de la concentración de CO₂ para el caso de Tp (Fig. 5.3B) al ser las pendientes iguales en ambas concentraciones. A pesar de ello, para un mismo valor de *gs* las plantas que crecieron a CO₂ elevado presentaron una mayor *A*. En el caso de Ac, las pendientes entre las concentraciones de CO₂ fueron diferentes, lo que indica que el CO₂ afectó la manera en que estaban relacionadas la *A* y la *gs* (Fig. 5.4B).

Igual que ocurrió en el día 9, la *Ci* en el día 16 tampoco presentó diferencias entre especies ni entre los tratamientos de competencia en condiciones de buen aporte hídrico (Fig. 5.2C; Tabla 5.4). El elevado CO₂, en condiciones de buen aporte hídrico, provocó un aumento de la *Ci* de alrededor de un 70% en ambas especies y tipos de competencia y también, de igual modo a lo ocurrido en el día 9, el cociente *Ci/Ca* no presentó diferencias (Fig. 5.2D). En Tp, la sequía disminuyó la *Ci* y el cociente *Ci/Ca* un 30% en monocultivo y un 35% en mezcla a CO₂ ambiental, mientras que a elevado CO₂ los descensos fueron alrededor del 40%, independientemente del tipo de competencia. La

sequía, en Ac, redujo la C_i y el cociente C_i/C_a un 34% en monocultivo y un 19% en mezcla a CO_2 ambiental, mientras que a CO_2 elevado la sequía los redujo un 30% en monocultivo y los aumentó en mezcla un 13%.

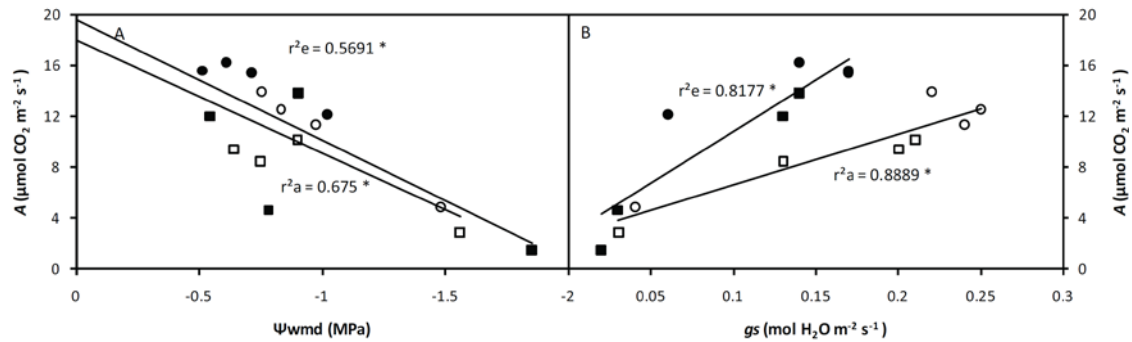


Fig. 5.4. Relationship for CO_2 assimilation rate (A) with leaf midday water potential (Ψ_{wmd}) (A) and stomatal conductance (g_s) (B) in Ac plants grown at ambient (a, open symbols) or elevated (e, closed symbols) CO_2 concentration. Circles for plants grown in monoculture and squares for plants grown in mixture. No significant differences were observed in (A) $F_{1,12} = 0.018$, $P = 0.897$, but differences between CO_2 concentration were observed for (B) $F_{1,12} = 7.109$, $P = 0.021$. The symbols used *, **, *** indicate significant correlation at 5%, 1% and 0.1%, respectively.

En la E se observaron diferencias entre especies, dependientes de la concentración de CO_2 (Fig. 5.2E; Tabla 5.4). En monocultivo, la E de Tp fue un 21% superior que la de Ac a CO_2 ambiental, mientras que a elevado CO_2 , la diferencia fue del 40%. En mezcla, las diferencias fueron mayores, del 40% a CO_2 ambiental y del 37% a elevado CO_2 . En el día 16, el aumento de la concentración de CO_2 redujo la E en condiciones de buen aporte hídrico un 32% en monocultivo y un 35% en mezcla en el caso de Tp, mientras que en Ac las caídas fueron del 41% y 32%, respectivamente. La sequía en Tp provocó una disminución en la E de un 60%, independientemente del tipo de competencia a CO_2 ambiental, mientras que a elevado CO_2 la reducción fue ligeramente superior, del 70%, también cualquiera que fuera el tipo de competencia. En Ac, a CO_2 ambiental, la sequía también redujo la E independientemente de la competencia, un 80%. En cambio, a elevado CO_2 , el descenso provocado por la sequía fue dependiente de la competencia, así, en monocultivo, el elevado CO_2 mitigó

parcialmente el efecto de la sequía, reduciéndose la *E* en un 50%, mientras que en mezcla el descenso fue el mismo que a CO₂ ambiental.

La *ITE* fue superior en Tp que en Ac a CO₂ ambiental, un 16% en monocultivo y un 30% en mezcla, mientras que a elevado CO₂ no se observaron diferencias (Fig. 5.2F; Tabla 5.4). El tipo de competencia no afectó a la *ITE* de ambas especies en condiciones de buen aporte hídrico, cualquiera que fuera la concentración de CO₂. El elevado CO₂, en condiciones de buen aporte hídrico, incrementó la *ITE* de Tp un 55% y un 66% en monocultivo y mezcla, respectivamente, y la de Ac, un 83% y un 91%, respectivamente. En sequía a CO₂ ambiental, la *ITE* aumentó en Tp un 70% en monocultivo y un 78% en mezcla. En condiciones de elevado CO₂, los incrementos fueron mayores, del 97% en monocultivo y del 108% en mezcla. En el caso de Ac, la sequía a CO₂ ambiental provocó un aumento de la *ITE* del 85% en monocultivo y del 48% en mezcla. A elevado CO₂, el comportamiento fue distinto, incrementándose en monocultivo un 70% y disminuyendo en mezcla un 43%.

5.2.3. Niveles de pigmentos en sequía progresiva

Tras 9 días sin regar, la concentración de las clorofilas *a* y *b* no se vio modificada por el tratamiento de CO₂, riego o competencia, pero sí por la especie, siendo los valores de las clorofilas *a* y *b* un 48% mayores en Tp que Ac en monocultivo (Fig. 5.5A-B; Tabla 5.3). La relación clorofila *a/b* tampoco se vio afectada por los diversos tratamientos, excepto en Tp cuando creció en mezcla, donde la sequía aumentó dicha relación un 5%, tanto a CO₂ ambiental como a elevado (Fig. 5.5C; Tabla 5.3). La concentración de carotenoides fue mayor en Tp que en Ac, un 70% en monocultivo y un 23% en mezcla a CO₂ ambiental, mientras que a elevado CO₂ las diferencias fueron del 50%, independientemente del tipo de competencia. La sequía sólo modificó la concentración de carotenoides en el caso de Tp cuando creció en monocultivo a CO₂ elevado, donde se redujo un 20% (Fig. 5.5D; Tabla 5.3).

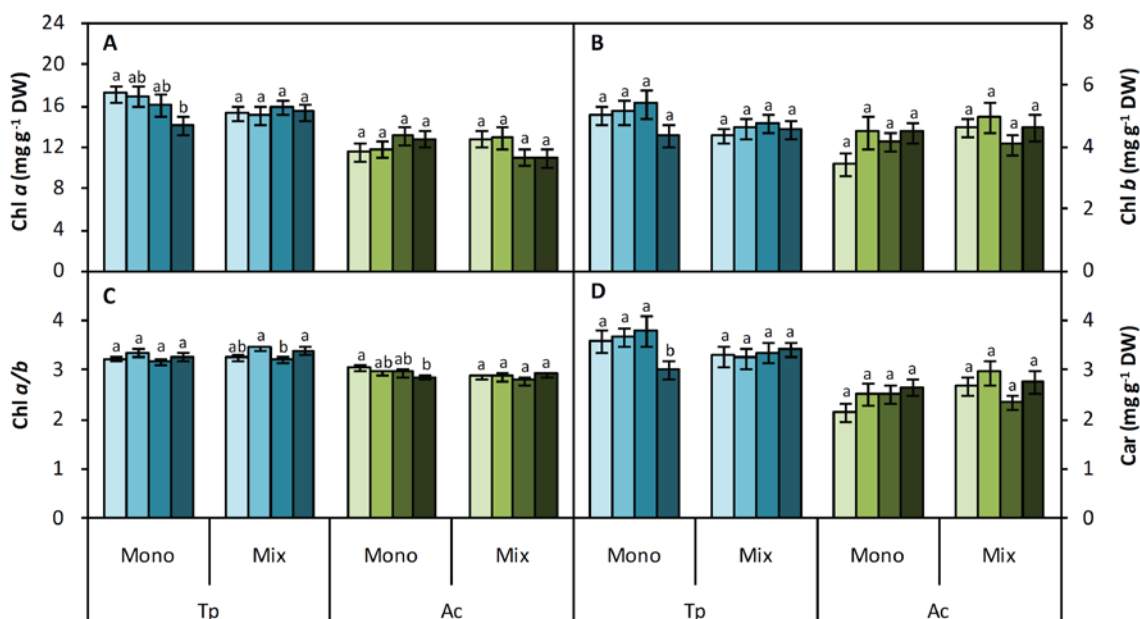


Fig. 5.5. Effects of drought, CO₂, and competition on chlorophyll *a* concentration (Chl *a*; A), chlorophyll *b* concentration (Chl *b*; B), chlorophyll *a/b* ratio (Chl *a/b*; C), and carotenoids concentration (Car; D) in the 9th day. Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 5.1.

5.2.4. Niveles de pigmentos en sequía homogénea

Cuando todos los tratamientos de sequía tuvieron el mismo contenido hídrico del suelo se observaron mayores diferencias en los pigmentos. Así, a CO₂ ambiental, la concentración de clorofila *a* fue mayor en Tp que en Ac, un 28% en monocultivo y un 60% en mezcla, mientras que bajo condiciones de elevado CO₂ las diferencias fueron ligeramente menores, del 16% y 30% en monocultivo y mezcla, respectivamente (Fig. 5.6A; Tabla 5.4). El aumento de la concentración de CO₂ sólo afectó a Tp en mezcla, donde disminuyó la concentración de clorofila *a* un 12%. La sequía redujo la concentración de clorofila *a* de Tp a CO₂ ambiental, un 23% en monocultivo y un 17% en mezcla, mientras que, a elevado CO₂, los descensos fueron ligeramente inferiores, un 21% y un 14% en monocultivo y mezcla, respectivamente. En el caso de Ac la sequía sólo produjo diferencias significativas en mezcla, reduciendo la concentración de clorofila *a* un 10% y 30% a CO₂ ambiental y elevado, respectivamente. En ambos

casos, la concentración en mezcla fue un 30% menor que la concentración en monocultivo.

A CO₂ ambiental, se observaron diferencias en la concentración de clorofila *b* entre las dos especies, siendo la concentración de Tp un 56% superior a la de Ac en monocultivo y un 30% en mezcla (Fig. 5.6B; Tabla 5.4). El elevado CO₂ en condiciones de buen aporte hídrico sólo afectó a Ac en mezcla, donde aumentó la concentración de clorofila *b* un 30%. A CO₂ ambiental, la sequía redujo la concentración en Tp un 24% en monocultivo y un 17% en mezcla, mientras que a CO₂ elevado los descensos fueron ligeramente inferiores, 23% y 15% para monocultivo y mezcla, respectivamente. En el caso de Ac, el efecto de la sequía varió en función del tipo de competencia. En monocultivo, la sequía incrementó la clorofila *b* un 52% a CO₂ ambiental y un 26% a CO₂ elevado. En cambio, en mezcla, la sequía redujo la concentración de clorofila *b*, un 11% a CO₂ ambiental y un 50% a CO₂ elevado.

La relación clorofila *a/b* no se vio afectada por los tratamientos de CO₂, riego y competencia, excepto en Ac cuando creció en mezcla, donde la sequía provocó un aumento del 20%, independientemente de la concentración de CO₂ (Fig. 5.6C; Tabla 5.4).

La concentración de carotenoides fue superior en Tp que en Ac, un 62% en monocultivo y un 77% en mezcla a CO₂ ambiental, mientras que, bajo condiciones de elevado CO₂, las diferencias fueron inferiores, del 17% y 42%, respectivamente (Fig. 5.6D; Tabla 5.4). En Tp, la concentración de carotenoides disminuyó un 14% en condiciones de buen aporte hídrico cuando las plantas fueron expuestas a elevado CO₂, independientemente del tipo de competencia. En cambio, en Ac, el elevado CO₂ aumentó la concentración un 18% en monocultivo y un 6% en mezcla, aunque no de manera significativa. La sequía hizo descender la concentración de carotenoides un 26% en monocultivo y un 20% en mezcla a CO₂ ambiental, mientras que a CO₂ elevado las reducciones fueron menores, 17% y 12% en monocultivo y mezcla, respectivamente. En Ac la sequía aumentó la concentración de carotenoides un 35% en monocultivo a CO₂ ambiental, pero no en mezcla ni a elevado CO₂. En sequía la concentración de carotenoides fue aproximadamente un 30% superior en monocultivo que en mezcla.

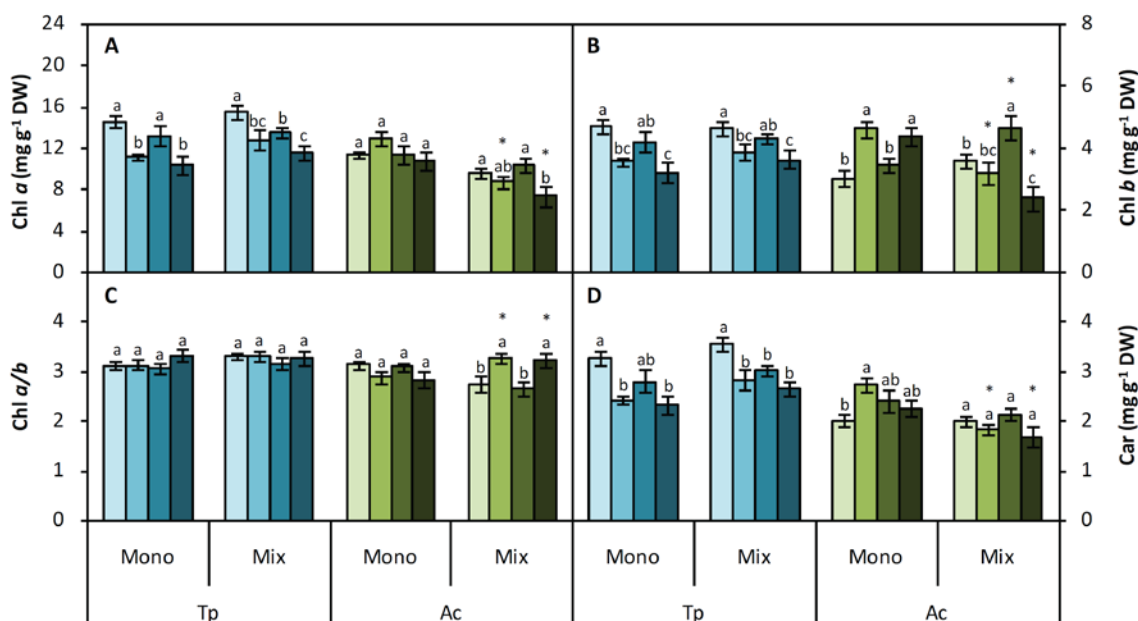


Fig. 5.6. Effects of drought, CO₂, and competition on chlorophyll *a* concentration (Chl *a*; A), chlorophyll *b* concentration (Chl *b*; B), chlorophyll *a/b* ratio (Chl *a/b*; C), and carotenoids concentration (Car; D) in the 16th day. Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 5.1.

5.2.5. Parámetros de fluorescencia en sequía progresiva

Tras 9 días en ausencia de riego, la eficiencia fotoquímica en hojas adaptadas a la oscuridad (F_v/F_m) no mostró ninguna diferencia entre tratamientos (Fig. 5.7A; Tabla 5.3). En general, Ac presentó valores inferiores de eficiencia fotoquímica en hojas adaptadas a la luz (F_v'/F_m') con respecto a Tp, entre un 10 y un 20% (Fig. 5.7B; Tabla 5.3). El F_v'/F_m' sólo se vio afectado por la sequía en Ac en mezcla, donde disminuyó un 5%, independientemente de la concentración de CO₂.

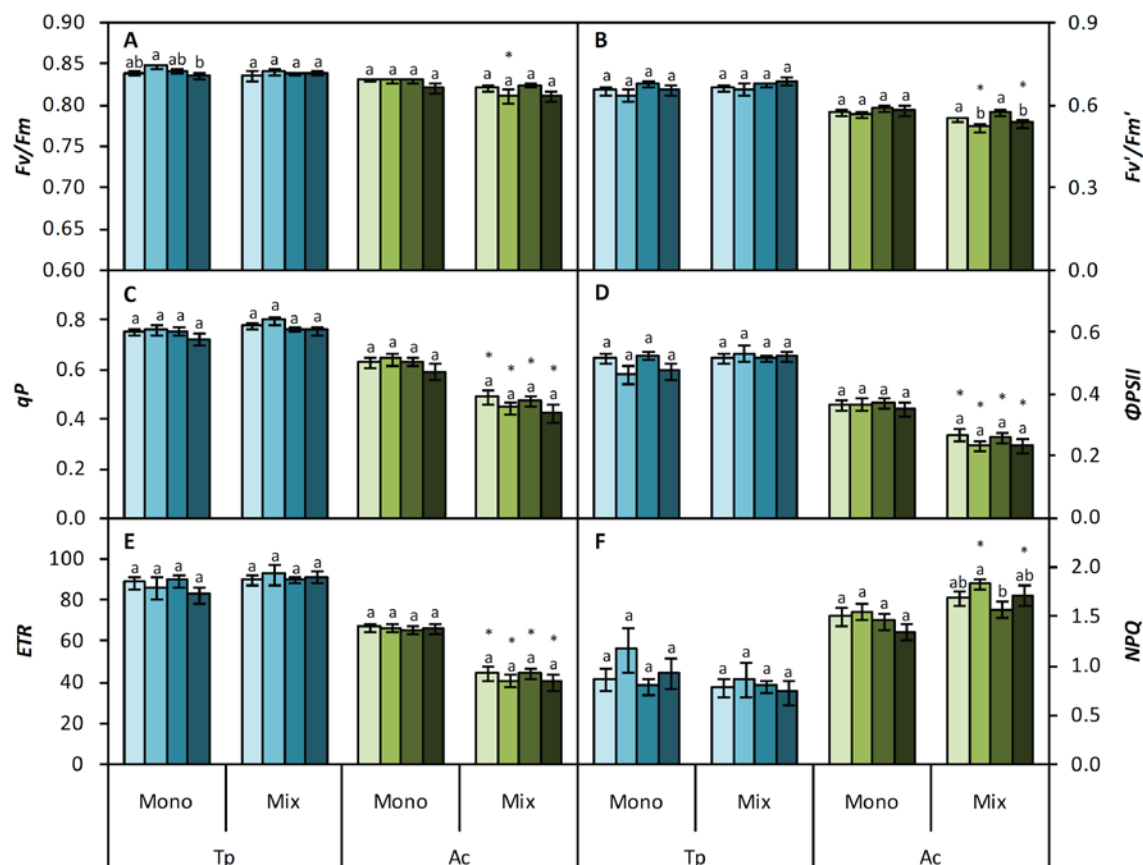


Fig. 5.7. Effects of drought, CO₂, and competition on photochemistry efficiency in dark adapted leaves (F_v/F_m ; A), photochemistry efficiency in light adapted leaves (F_v/F_m' ; B), photochemical *quenching* (qP ; C), actual quantum yield of PSII (Φ_{PSII} ; D), electron transport rate (ETR ; E), and non-photochemical *quenching* (NPQ ; F) in day 9th. Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 5.1.

En condiciones de buen aporte hídrico, el *quenching* fotoquímico (qP), el rendimiento cuántico del PSII (Φ_{PSII}) y la tasa de transporte de electrones (ETR) fueron mayores en Tp que en Ac, concretamente, en monocultivo la diferencia fue del 20% en el qP y del 40% en el Φ_{PSII} y el ETR , cualquiera que fuera la concentración de CO₂. En cambio, en mezcla las diferencias fueron mayores, del 60% en el qP y del 90% en el Φ_{PSII} y el ETR , también independientemente de la concentración de CO₂ (Fig. 5.7C-E; Tabla 5.3). El tipo de competencia afectó a Ac, siendo los valores de qP , Φ_{PSII} y ETR alrededor de un 25% superiores en monocultivo que en mezcla. El elevado CO₂ y la sequía no provocaron diferencias en el qP , en el Φ_{PSII} y en el ETR en ambas especies.

El *quenching* no fotoquímico (*NPQ*) mostró la tendencia opuesta, siendo los valores mayores en Ac que en Tp, un 75% y un 110% en monocultivo y mezcla, respectivamente, en condiciones de buen aporte hídrico e independientemente de la concentración de CO₂ (Fig. 5.7F; Tabla 5.3). El elevado CO₂ y la sequía tampoco provocaron diferencias en el *NPQ*.

5.2.6. Parámetros de fluorescencia en sequía homogénea

En el día 16, cuando la disponibilidad de agua en el suelo era la misma para todos los tratamientos, el parámetro F_v/F_m estuvo por encima de 0,80 en todos los tratamientos, excepto Ac en mezcla, donde a elevado CO₂ la sequía redujo el F_v/F_m un 13%, hasta 0,72 (Fig. 5.8A; Tabla 5.4).

En el día 16, Ac volvió a presentar, en general, valores inferiores (10-20%) de F_v'/F_m' que Tp (Fig. 5.8B; Tabla 5.4). La sequía a CO₂ ambiental redujo el F_v'/F_m' de Tp un 16% y un 19% en monocultivo y mezcla, respectivamente; mientras que a elevado CO₂ los descensos fueron del 19% en monocultivo y del 10% en mezcla. En Ac, la sequía disminuyó el F_v'/F_m' un 9% en monocultivo y un 19% en mezcla en condiciones de CO₂ ambiental, mientras que bajo elevado CO₂ no se produjo el descenso en monocultivo, y en mezcla se exacerbó la caída, disminuyendo un 35%.

Como ocurrió en el día 9, en el día 16, los valores de los parámetros qP , Φ_{PSII} y ETR fueron mayores en Tp que en Ac, independientemente de la concentración de CO₂, en monocultivo un 20%, un 40% y un 40%, para el qP , el Φ_{PSII} y el ETR , respectivamente, y en mezcla un 50%, un 70% y un 70%, respectivamente (Fig. 5.8C-E; Tabla 5.4). En Tp no se observaron diferencias entre los tratamientos de competencia en condiciones de buen aporte hídrico, mientras que en Ac los parámetros qP , Φ_{PSII} y ETR fueron alrededor de un 25% superiores en monocultivo que en mezcla, cualquiera que fuera la concentración de CO₂. En el caso de Tp, la sequía a CO₂ ambiental redujo el Φ_{PSII} y el ETR un 21% y un 26% en monocultivo y mezcla, respectivamente,

mientras que a elevado CO₂ los descensos fueron del 38% y del 26%, respectivamente. En cambio, el *qP* a CO₂ ambiental sólo se redujo por la sequía en mezcla, cayendo un 10%, mientras que a elevado CO₂ los descensos fueron superiores, del 21% en monocultivo y del 16% en mezcla. En Ac a CO₂ ambiental sólo se detectaron cambios en el Φ_{PSII} y en el *ETR*, disminuyendo ambos parámetros un 13% en monocultivo y un 20% en mezcla. Los descensos del Φ_{PSII} y del *ETR* observados en monocultivo no se produjeron a elevado CO₂, mientras que en mezcla aumentó la caída a un 40%. En Ac no se detectaron diferencias provocadas por el CO₂ o la sequía en el *qP*.

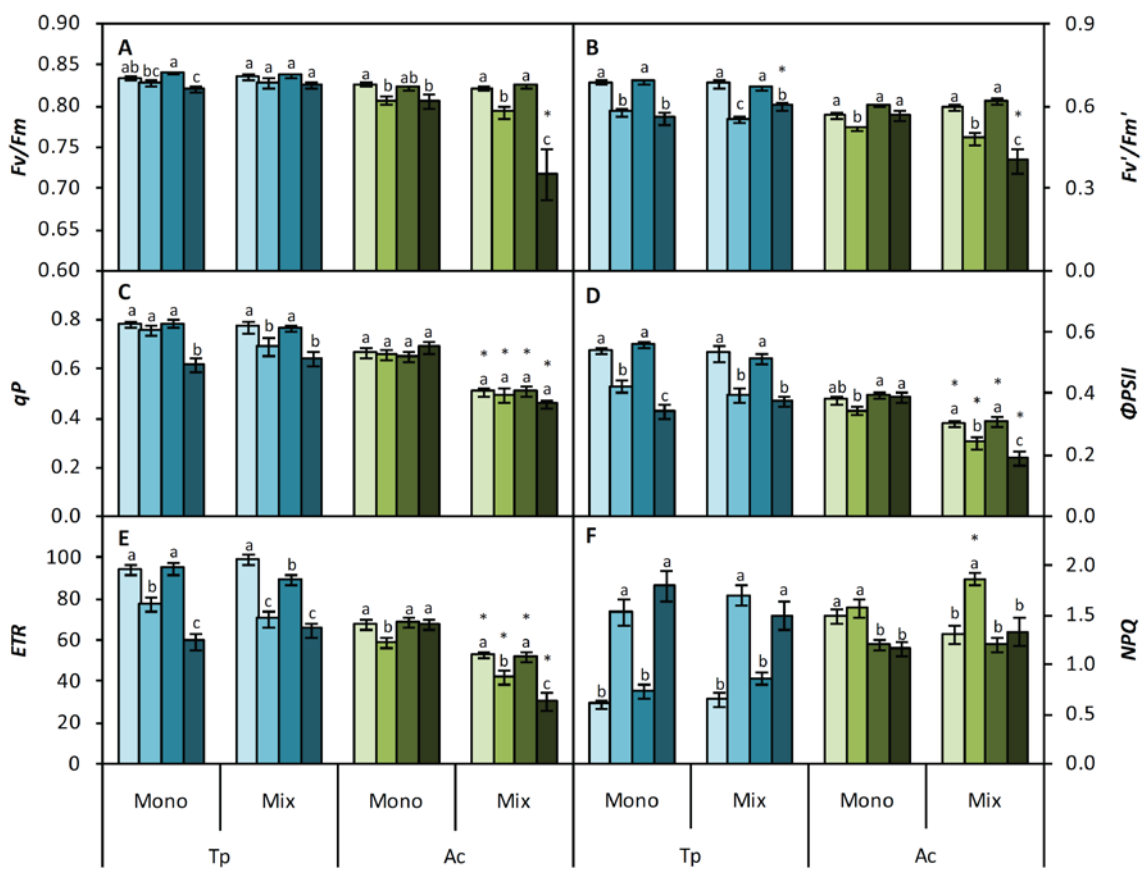


Fig. 5.8. Effects of drought, CO₂, and competition on photochemistry efficiency in dark adapted leaves (*Fv/Fm*; A), photochemistry efficiency in light adapted leaves (*Fv/Fm'*; B), photochemical *quenching* (*qP*; C), actual quantum yield of PSII (Φ_{PSII} ; D), electron transport rate (*ETR*; E), and non-photochemical *quenching* (*NPQ*; F) in day 16th. Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 5.1.

De nuevo, los valores del *NPQ* de Ac fueron superiores a los de Tp a CO₂ ambiental, un 150% y un 100% en monocultivo y mezcla, respectivamente (Fig. 5.8F; Tabla 5.4). A elevado CO₂ las diferencias entre especies fueron menores, del 64% en monocultivo y del 40% en mezcla, siempre a favor de Ac. La sequía a CO₂ ambiental aumentó el *NPQ* de Tp un 153% y un 160% en monocultivo y mezcla, respectivamente. A elevado CO₂ los incrementos fueron inferiores, 145% en monocultivo y 73% en mezcla. En el caso de Ac, el elevado CO₂ disminuyó el *NPQ* un 20% en monocultivo tanto en condiciones de buen aporte hídrico como en sequía. La sequía sólo produjo un aumento en mezcla a CO₂ ambiental (42%), pero a elevado CO₂ no hubo diferencias.

5.2.7. Niveles de azúcares en sequía progresiva

La concentración de glucosa, en condiciones de buen aporte hídrico a CO₂ ambiental, fue superior en Tp que en Ac, un 20% en monocultivo y un 80% en mezcla, mientras que a CO₂ elevado, la diferencia fue del 150%, independientemente del tipo de competencia (Fig. 5.9A; Tabla 5.3). En condiciones de buen aporte hídrico, la concentración de glucosa de Tp fue un 27% menor en mezcla que en monocultivo en ambas concentraciones de CO₂. En el caso de Ac, la concentración en mezcla fue un 50% inferior que en monocultivo a CO₂ ambiental y un 21% a CO₂ elevado. La sequía produjo un incremento en la concentración de glucosa en Tp en monocultivo del 100%, cualquiera que fuera la concentración de CO₂, mientras que en mezcla el incremento sólo fue significativo a elevado CO₂, concretamente 6 veces superior. En cambio, en Ac la sequía sólo produjo un incremento significativo en mezcla a elevado CO₂, donde aumentó 3,6 veces la concentración de glucosa con respecto a las plantas bajo buen aporte hídrico.

La concentración de fructosa también fue superior en Tp que en Ac. En monocultivo fue dependiente de la concentración de CO₂, siendo un 35% superior a CO₂ ambiental y un 87% a elevado CO₂, mientras que en mezcla fue un 100% superior, independiente del tratamiento de CO₂ (Fig. 5.9B; Tabla 5.3). En condiciones de déficit

hídrico, la concentración de fructosa aumentó un 100% en Tp a CO₂ ambiental en monocultivo, pero no en mezcla, donde el incremento no fue estadísticamente significativo. A elevado CO₂, se registraron aumentos en ambos tipos de competencia en Tp, 3 veces en monocultivo y 4,3 veces en mezcla. En el caso de Ac no hubo diferencias entre los tratamientos de CO₂ y riego.

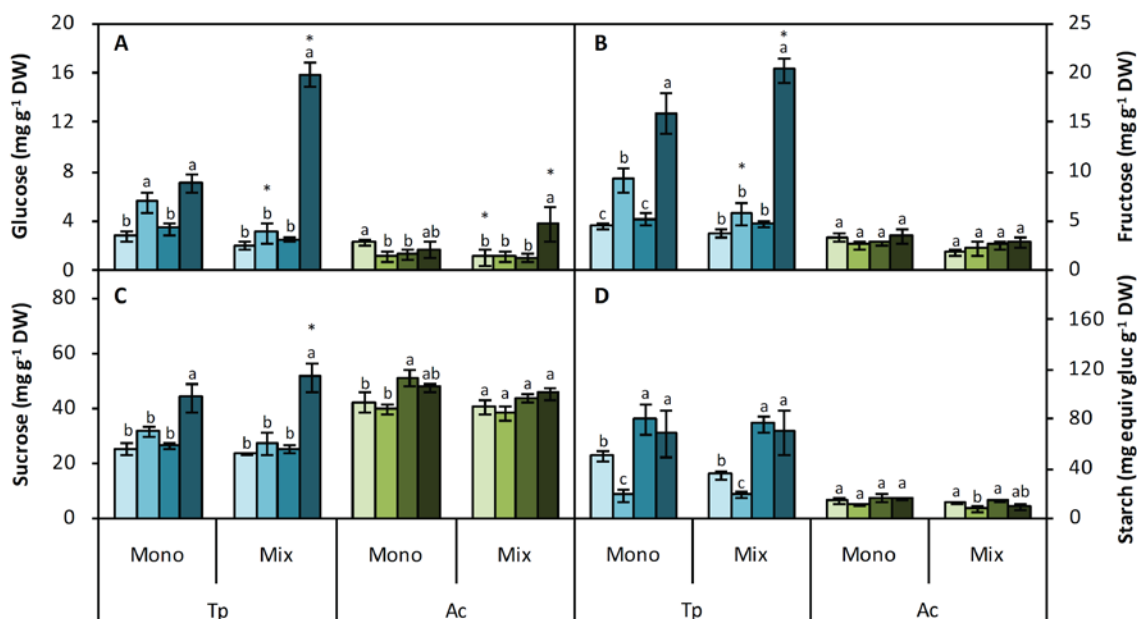


Fig. 5.9. Effects of drought, CO₂, and competition on glucose concentration (A), fructose concentration (B), sucrose concentration (C), and starch concentration (D) in the 9th day. Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 5.1.

En la figura 5.9C se visualiza la concentración de sacarosa que, de manera opuesta a los otros azúcares mencionados, fue superior en Ac que en Tp, un 66% en monocultivo y un 72% en mezcla a CO₂ ambiental, y un 92% y un 72% a CO₂ elevado, respectivamente (Tabla 5.3). El elevado CO₂ en condiciones de buen aporte hídrico no afectó a la concentración de sacarosa en Tp, mientras que en Ac aumentó la concentración un 20% en monocultivo. La sequía aumentó la concentración de sacarosa en Tp, pero sólo de forma significativa a elevado CO₂, un 65% en monocultivo y un 102% en mezcla. En el caso de Ac la sequía no provocó ninguna diferencia significativa.

La concentración de almidón de Tp fue mayor que la de Ac, 3,7 veces en monocultivo y 2,8 veces en mezcla a CO₂ ambiental, mientras que a CO₂ elevado las diferencias fueron mayores, alrededor de 5 veces, independientemente del tipo de competencia (Fig. 5.9D; Tabla 5.3). El aumento de la concentración externa de CO₂ aumentó la concentración de almidón de Tp en condiciones de buen aporte hídrico, un 57% y un 118% en monocultivo y mezcla, respectivamente, mientras que no afectó en Ac. La sequía sólo redujo la concentración de almidón a CO₂ ambiental, en Tp un 63% en monocultivo y un 45% en mezcla, mientras que en Ac sólo la disminuyó en mezcla, un 40%.

5.2.8. Niveles de azúcares en sequía homogénea

La figura 5.10A muestra la concentración de glucosa. En condiciones de buen aporte hídrico a CO₂ ambiental, en monocultivo la concentración fue un 135% mayor en Tp que en Ac, mientras que en mezcla, la concentración de glucosa fue superior en Ac que en Tp (Tabla 5.4). A elevado CO₂, en ambos tipos de competencia, la concentración de glucosa de Tp fue aproximadamente un 65% mayor que en Ac. En Tp no se detectaron diferencias entre los tratamientos de competencia, sin embargo, en Ac la concentración en mezcla fue 6 veces superior a la de monocultivo a CO₂ ambiental. En condiciones de déficit hídrico, la concentración de glucosa de Tp aumentó en monocultivo un 120% a CO₂ ambiental y 3,2 veces a CO₂ elevado; en mezcla la tendencia fue la opuesta, observándose un mayor incremento a CO₂ ambiental que a elevado CO₂, un 220% y un 120%, respectivamente. En Ac, la sequía a CO₂ ambiental sólo produjo un incremento significativo en mezcla, siendo éste de un 48%, mientras que a elevado CO₂ la concentración aumentó un 160% en monocultivo y un 200% en mezcla.

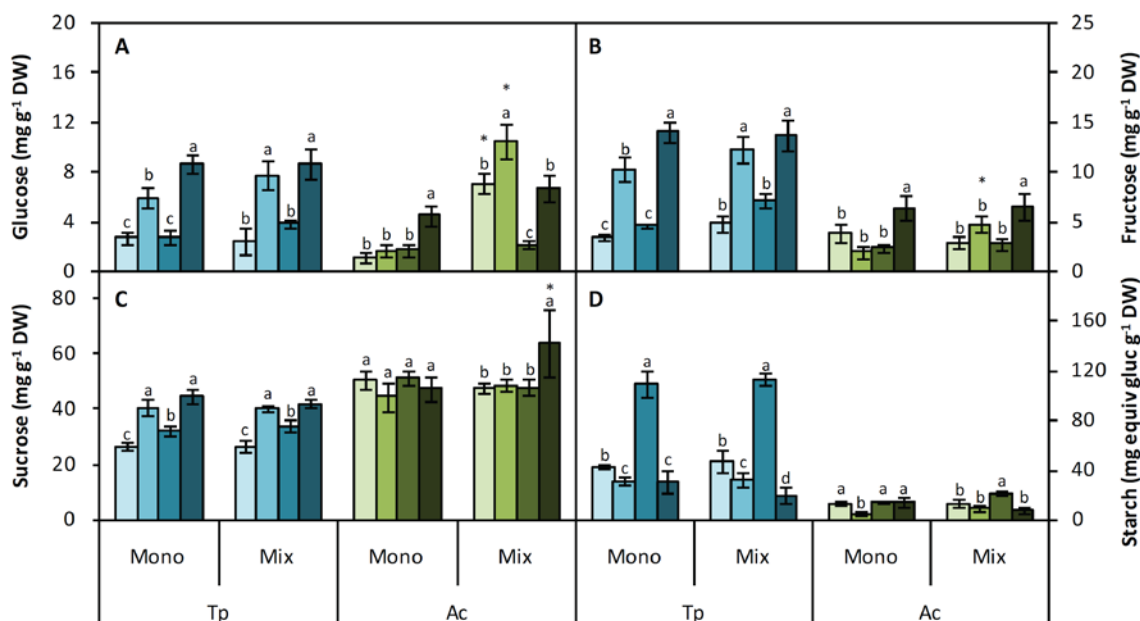


Fig. 5.10. Effects of drought, CO₂, and competition on glucose concentration (A), fructose concentration (B), sucrose concentration (C), and starch concentration (D) in the 16th day. Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 5.1.

La concentración de fructosa fue, en general, mayor en Tp que en Ac; en monocultivo a CO₂ elevado fue un 95% superior, mientras que en mezcla fue un 64% a CO₂ ambiental y un 160% a elevado (Fig. 5.10B; Tabla 5.4). La sequía aumentó la concentración de fructosa de Tp en monocultivo un 200%, independientemente de la concentración de CO₂, mientras que en mezcla los aumentos sí fueron dependientes de la concentración de CO₂, un 154% a CO₂ ambiental y un 91% a CO₂ elevado. En el caso de Ac, la sequía incrementó la concentración a elevado CO₂, tanto en monocultivo como en mezcla, aproximadamente un 150%.

La concentración de sacarosa se observa en la figura 5.10C. Tal y como ocurrió en el día 9, en condiciones de buen aporte hídrico, la concentración de Ac fue superior a la de Tp, un 85% a CO₂ ambiental y un 50% a CO₂ elevado, cualquiera que fuera el tipo de competencia (Tabla 5.4). El aumento de la concentración de CO₂, en condiciones de buen aporte hídrico, aumentó la concentración de sacarosa en Tp, un 22% en monocultivo y un 28% en mezcla, pero no afectó a la concentración de Ac. El déficit hídrico incrementó la concentración de sacarosa en Tp, un 50% a CO₂ ambiental,

independientemente del tipo de competencia, mientras que a CO₂ elevado el aumento sí fue dependiente del tipo de competencia, un 38% en monocultivo y un 24% en mezcla. En el caso de Ac la sequía sólo aumentó la concentración en mezcla a elevado CO₂, un 33%.

Igual que se observó en el día 9, en el día 16, la concentración de almidón de Tp fue mayor que la de Ac, alrededor de 3,3 veces a CO₂ ambiental, independientemente del tipo de competencia, y a CO₂ elevado 8 veces en monocultivo y 5 veces en mezcla (Fig. 5.10D; Tabla 5.4). Cuando las plantas crecieron bajo elevado CO₂, la concentración de almidón se incrementó, en Tp alrededor de un 150%, tanto en monocultivo como en mezcla, mientras que en Ac sólo aumentó la concentración en mezcla, un 57%. Cuando las plantas crecieron en sequía la concentración de almidón disminuyó en Tp, de manera dependiente de la concentración de CO₂. Así, a CO₂ ambiental, se redujo alrededor de un 30% tanto en monocultivo como en mezcla y, a CO₂ elevado, la reducción fue del 80%, independientemente del tipo de competencia. En el caso de Ac, en monocultivo la concentración sólo se redujo con la sequía a CO₂ ambiental (63%), mientras que a CO₂ elevado no se registró un descenso en monocultivo, pero sí en mezcla, un 60%.

5.2.9. Actividad Rubisco en sequía progresiva

La actividad Rubisco máxima fue superior en Tp que en Ac, concretamente, en monocultivo un 110% a CO₂ ambiental y un 60% a CO₂ elevado; mientras que en mezcla las diferencias fueron del 38% a CO₂ ambiental y del 17% a CO₂ elevado (Tabla 5.1). El elevado CO₂ disminuyó la actividad máxima en ambas especies, un 30% en Tp y un 15% en Ac, independientemente del tipo de competencia. La sequía redujo la actividad en Tp, de manera dependiente de la concentración de CO₂; así, a CO₂ ambiental los descensos fueron del 43%, independientemente del tipo de competencia, y a CO₂ elevado fueron del 20% en monocultivo y del 36% en mezcla. En el caso de Ac, la sequía aumentó la actividad un 10% en monocultivo y la redujo en mezcla un 14%.

El estado de activación de la enzima Rubisco fue mayor en Ac que en Tp a CO₂ ambiental y condiciones de buen aporte hídrico (Tabla 5.1). El efecto del elevado CO₂ varió en función de la especie, así, en Ac disminuyó un 47% en monocultivo y un 35% en mezcla, mientras que en Tp aumentó un 14% en monocultivo y se mantuvo constante en mezcla. La sequía disminuyó el estado de activación de Tp cuando creció en monocultivo, un 20% a CO₂ ambiental y un 38% a CO₂ elevado y no fue afectada en mezcla. En el caso de Ac, la sequía produjo efectos dependientes de la concentración de CO₂; así, a CO₂ ambiental redujo el estado de activación, mientras que a CO₂ elevado lo aumentó.

Table 5.1. Effects of drought, CO₂, and competition on Rubisco total activity ($\mu\text{mol NADH mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$), and activation state (%) in the 9th day. Tp denotes *Trifolium pratense*; Ac, *Agrostis capillaris*; D, drought; WW, well-watered.

| | | Tp | | | | Ac | | | |
|------------------|-------------|------------------------------|------|------------------------------|------|------------------------------|------|------------------------------|------|
| | | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | |
| | | WW | D | WW | D | WW | D | WW | D |
| Rubisco activity | Monoculture | 4.89 | 2.66 | 3.15 | 2.52 | 2.33 | 2.56 | 1.98 | 3.00 |
| | Mixture | 4.14 | 2.37 | 2.95 | 1.87 | 3.00 | 2.59 | 2.53 | 2.30 |
| Activation state | Monoculture | 74.7 | 56.7 | 88.4 | 50.7 | 98.0 | 68.8 | 51.5 | 73.2 |
| | Mixture | 72.8 | 70.3 | 74.4 | 76.5 | 97.9 | 86.6 | 62.4 | 97.6 |

5.2.10. Actividad Rubisco en sequía homogénea

Bajo condiciones de buen aporte hídrico, la actividad Rubisco máxima, el día 16, fue superior en Tp que en Ac, un 40% en ambos tipos de competencia a CO₂ ambiental, no observándose diferencias significativas a elevado CO₂ (Tabla 5.2). El elevado CO₂, en condiciones de buen aporte hídrico, redujo la actividad en Tp un 32% en monocultivo y un 15% en mezcla. La sequía redujo la actividad de Tp un 39% a CO₂ ambiental, independientemente del tipo de competencia, y bajo condiciones de elevado CO₂ un 18% en monocultivo y un 30% en mezcla. En Ac, tal y como ocurrió en el día

9, la sequía aumentó la actividad en monocultivo y la disminuyó en mezcla, siendo las diferencias más notables bajo elevado CO₂.

El estado de activación de la rubisco, en el día 16, no fue diferente entre especies en condiciones de buen aporte hídrico (Tabla 5.2). El elevado CO₂ disminuyó el estado de activación en ambas especies en monocultivo, un 10% en Tp y un 25% en Ac. La sequía aumentó el estado de activación de Tp a CO₂ ambiental, mientras que no lo varió a CO₂ elevado. En el caso de Ac, la sequía sólo afectó a CO₂ ambiental, donde fue dependiente del tipo de competencia, así en monocultivo lo disminuyó un 22% y en mezcla lo aumentó un 18%.

Table 5.2. Effects of drought, CO₂, and competition on Rubisco total activity ($\mu\text{mol NADH mg}^{-1} \text{ prot min}^{-1}$), and activation state (%) in the 16th day. Tp denotes *Trifolium pratense*; Ac, *Agrostis capillaris*; D, drought; WW, well-watered.

| | | Tp | | | | Ac | | | |
|------------------|-------------|------------------------------|------|------------------------------|------|------------------------------|------|------------------------------|------|
| | | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | |
| | | WW | D | WW | D | WW | D | WW | D |
| Rubisco activity | Monoculture | 3.36 | 2.03 | 2.29 | 1.87 | 2.36 | 2.71 | 2.10 | 3.09 |
| | Mixture | 3.09 | 1.87 | 2.62 | 1.85 | 2.21 | 1.90 | 2.97 | 1.70 |
| Activation state | Monoculture | 87.5 | 93.4 | 77.6 | 76.5 | 88.8 | 65.9 | 63.1 | 68.2 |
| | Mixture | 85.4 | 92.0 | 85.5 | 75.8 | 70.2 | 88.6 | 78.1 | 76.0 |

Table 5.3. Summary of ANOVA results (*P*-values) for the effects of CO₂ (ambient and elevated), competition (monoculture and mixture), water (well-watered and drought), and species (Ac and Tp) and their interactions in the 9th day. Bold values indicate significance at *P*≤0.05.

| | A | gs | Ci | E | ITE | Fv/Fm | ΦPSII | Fv/Fm' | qp | NPQ | Chl a | Chl b | Car | Chl a/b | ETR | Glu | Fru | Sac | Alm |
|--------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| CO ₂ | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.310 | 0.879 | 0.014 | 0.042 | 0.041 | 0.246 | 0.857 | 0.787 | 0.070 | 0.681 | 0.001 | 0.010 | 0.000 | 0.000 |
| Comp | 0.000 | 0.113 | 0.893 | 0.015 | 0.466 | 0.001 | 0.000 | 0.186 | 0.000 | 0.390 | 0.217 | 0.937 | 0.868 | 0.822 | 0.000 | 0.506 | 0.556 | 0.871 | 0.305 |
| Water | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.144 | 0.048 | 0.072 | 0.155 | 0.143 | 0.397 | 0.349 | 0.510 | 0.034 | 0.303 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.014 |
| Sp | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.024 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| CO ₂ xComp | 0.014 | 0.115 | 0.284 | 0.026 | 0.471 | 0.220 | 0.760 | 0.869 | 0.895 | 0.605 | 0.661 | 0.546 | 0.658 | 0.537 | 0.939 | 0.001 | 0.097 | 0.663 | 0.796 |
| CO ₂ xWater | 0.011 | 0.658 | 0.000 | 0.392 | 0.000 | 0.051 | 0.728 | 0.974 | 0.146 | 0.299 | 0.414 | 0.155 | 0.303 | 0.600 | 0.739 | 0.020 | 0.077 | 0.065 | 0.306 |
| CO ₂ xSp | 0.002 | 0.011 | 0.000 | 0.411 | 0.000 | 0.099 | 0.699 | 0.796 | 0.939 | 0.878 | 0.634 | 0.950 | 0.766 | 0.987 | 0.965 | 0.480 | 0.070 | 0.881 | 0.000 |
| CompxWater | 0.809 | 0.530 | 0.952 | 0.828 | 0.756 | 0.587 | 0.334 | 0.941 | 0.754 | 0.904 | 0.612 | 0.711 | 0.273 | 0.064 | 0.646 | 0.061 | 0.723 | 0.399 | 0.655 |
| CompxSp | 0.000 | 0.000 | 0.076 | 0.000 | 0.308 | 0.023 | 0.000 | 0.002 | 0.000 | 0.001 | 0.749 | 0.023 | 0.037 | 0.008 | 0.000 | 0.571 | 0.438 | 0.347 | 0.911 |
| WaterxSp | 0.155 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.010 | 0.992 | 0.458 | 0.187 | 0.645 | 0.394 | 0.034 | 0.024 | 0.012 | 0.885 | 0.019 | 0.000 | 0.000 | 0.088 |
| CO ₂ xCompxWater | 0.005 | 0.145 | 0.446 | 0.094 | 0.707 | 0.384 | 0.783 | 0.874 | 0.452 | 0.689 | 0.604 | 0.258 | 0.106 | 0.505 | 0.885 | 0.067 | 0.208 | 0.052 | 0.667 |
| CO ₂ xCompxSp | 0.001 | 0.211 | 0.542 | 0.758 | 0.582 | 0.918 | 0.698 | 0.875 | 0.782 | 0.722 | 0.002 | 0.111 | 0.033 | 0.614 | 0.956 | 0.275 | 0.098 | 0.033 | 0.598 |
| CO ₂ xWaterxSp | 0.286 | 0.292 | 0.000 | 0.741 | 0.000 | 0.724 | 0.904 | 0.819 | 0.935 | 0.732 | 0.720 | 0.454 | 0.479 | 0.606 | 0.603 | 0.795 | 0.154 | 0.031 | 0.395 |
| CompxWaterxSp | 0.000 | 0.003 | 0.000 | 0.000 | 0.005 | 0.335 | 0.032 | 0.067 | 0.227 | 0.084 | 0.699 | 0.332 | 0.517 | 0.532 | 0.100 | 0.207 | 0.460 | 0.388 | 0.359 |
| CO ₂ xCompxWaterxSp | 0.025 | 0.643 | 0.692 | 0.987 | 0.944 | 0.795 | 0.657 | 0.597 | 0.752 | 0.804 | 0.785 | 0.881 | 0.488 | 0.676 | 0.728 | 0.299 | 0.061 | 0.670 | 0.762 |

Table 5.4. Summary of ANOVA results (*P*-values) for the effects of CO₂ (ambient and elevated), competition (monoculture and mixture), water (well-watered and drought), and species (Ac and Tp) and their interactions in the 16th day. Bold values indicate significance at $P \leq 0.05$.

| | <i>A</i> | <i>gs</i> | <i>Ci</i> | <i>E</i> | <i>ITE</i> | <i>Fv/Fm</i> | <i>OPSII</i> | <i>Fv/Fm'</i> | <i>qP</i> | <i>NPQ</i> | <i>Chl a</i> | <i>Chl b</i> | <i>Car</i> | <i>Chl a/b</i> | <i>ETR</i> | <i>Glu</i> | <i>Fru</i> | <i>Sac</i> | <i>Alm</i> |
|--------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| CO ₂ | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.015 | 0.218 | 0.571 | 0.019 | 0.014 | 0.006 | 0.371 | 0.035 | 0.531 | 0.004 | 0.778 | 0.000 | 0.007 | 0.007 |
| Comp | 0.000 | 0.963 | 0.000 | 0.012 | 0.001 | 0.001 | 0.000 | 0.009 | 0.000 | 0.365 | 0.031 | 0.462 | 0.486 | 0.398 | 0.000 | 0.209 | 0.019 | 0.375 | 0.375 |
| Water | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.000 | 0.032 | 0.000 | 0.038 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Sp | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.013 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| CO ₂ xComp | 0.038 | 0.322 | 0.007 | 0.893 | 0.059 | 0.025 | 0.279 | 0.208 | 0.715 | 0.395 | 0.847 | 0.712 | 0.930 | 0.388 | 0.101 | 0.242 | 0.251 | 0.413 | 0.413 |
| CO ₂ xWater | 0.495 | 0.000 | 0.009 | 0.000 | 0.022 | 0.002 | 0.070 | 0.476 | 0.045 | 0.029 | 0.311 | 0.048 | 0.528 | 0.377 | 0.143 | 0.436 | 0.005 | 0.477 | 0.477 |
| CO ₂ xSp | 0.069 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.014 | 0.109 | 0.832 | 0.074 | 0.000 | 0.409 | 0.087 | 0.080 | 0.663 | 0.013 | 0.464 | 0.361 | 0.980 | 0.980 |
| CompxWater | 0.025 | 0.120 | 0.000 | 0.946 | 0.001 | 0.002 | 0.261 | 0.003 | 0.268 | 0.389 | 0.290 | 0.000 | 0.132 | 0.002 | 0.053 | 0.846 | 0.578 | 0.109 | 0.109 |
| CompxSp | 0.000 | 0.004 | 0.000 | 0.029 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.031 | 0.000 | 0.587 | 0.000 | 0.034 | 0.000 | 0.281 | 0.000 | 0.298 | 0.480 | 0.284 | 0.284 |
| WaterxSp | 0.507 | 0.000 | 0.000 | 0.023 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.644 | 0.000 | 0.000 | 0.009 | 0.003 | 0.000 | 0.698 | 0.000 | 0.400 | 0.000 | 0.004 | 0.004 |
| CO ₂ xCompxWater | 0.001 | 0.824 | 0.002 | 0.228 | 0.024 | 0.018 | 0.906 | 0.651 | 0.886 | 0.024 | 0.981 | 0.276 | 0.385 | 0.944 | 0.716 | 0.421 | 0.225 | 0.525 | 0.525 |
| CO ₂ xCompxSp | 0.011 | 0.153 | 0.000 | 0.855 | 0.002 | 0.033 | 0.064 | 0.004 | 0.172 | 0.248 | 0.344 | 0.842 | 0.755 | 0.512 | 0.051 | 0.346 | 0.450 | 0.352 | 0.352 |
| CO ₂ xWaterxSp | 0.325 | 0.384 | 0.000 | 0.048 | 0.000 | 0.076 | 0.326 | 0.058 | 0.032 | 0.465 | 0.061 | 0.016 | 0.005 | 0.417 | 0.380 | 0.776 | 0.218 | 0.081 | 0.081 |
| CompxWaterxSp | 0.015 | 0.172 | 0.000 | 0.812 | 0.000 | 0.001 | 0.008 | 0.000 | 0.348 | 0.015 | 0.024 | 0.000 | 0.025 | 0.000 | 0.076 | 0.911 | 0.430 | 0.027 | 0.027 |
| CO ₂ xCompxWaterxSp | 0.000 | 0.005 | 0.011 | 0.022 | 0.008 | 0.004 | 0.009 | 0.002 | 0.045 | 0.525 | 0.962 | 0.316 | 0.360 | 0.718 | 0.000 | 0.661 | 0.615 | 0.243 | 0.243 |

5.3. Discusión

5.3.1. Diferencia entre especies

En condiciones de CO₂ ambiental y en plantas bajo buen aporte hídrico, se observaron diferencias entre especies. Tp presentó una tasa de asimilación de CO₂ (*A*) más alta que Ac (Figs. 5.1A y 5.2A). También se registró una mayor conductancia estomática (*g_s*) en Tp, pero ésta no fue la causa de la mayor *A*, ya que la concentración intercelular de CO₂ (*C_i*) fue similar entre especies (Figs. 5.1 y 5.2); es decir, para una misma *C_i* las plantas de Tp mostraron una *A* superior a la de Ac.

Los menores valores de *A* de Ac podrían deberse a una limitación, bien en la fase lumínica, bien en la fase oscura o bien en ambas. La concentración de pigmentos fue inferior en Ac que en Tp (Figs. 5.5 y 5.6), lo que podría indicar que Ac captaba una menor cantidad de energía que Tp. Además de esta menor absorción de luz, los menores valores de eficiencia fotoquímica (*F_v'/F_m'*, *qP*, *ΦPSII* y *ETR*) observados en Ac (Figs. 5.7 y 5.8) demuestran que de los fotones absorbidos una menor proporción es destinada a procesos fotoquímicos en Ac que en Tp. El aumento del *NPQ* (Figs. 5.7F y 5.8F) indicaría que la energía de estos fotones se disipaba en forma de calor. Esto podría deberse a una mayor actividad del ciclo VAZ (Müller et al., 2001), sin cambiar la concentración de carotenoides totales como propusieron Abadía et al. (1999). El hecho de que Ac desvíe parte de la energía que recibe en forma de calor por aumento del *NPQ*, en comparación con Tp, podría indicar que el requerimiento de luz de Ac es menor que el de Tp, y que bajo condiciones de luz de 400 μmol m⁻² s⁻¹, Ac recibe una cantidad de energía mayor de la que es capaz de utilizar en los procesos fotoquímicos.

Esta menor capacidad de utilizar la energía en procesos fotoquímicos podría deberse a una menor actividad del ciclo de Calvin, como se demuestra por la menor actividad de la enzima Rubisco detectada en Ac comparando con Tp (Tablas 5.1 y 5.2) y, por tanto, disminuye el consumo de NADPH y ATP y su necesidad de regeneración.

5.3.2. Efecto de la competencia en condiciones ambientales

La competencia, bajo CO_2 ambiental y en plantas con buen aporte hídrico, no produjo ningún efecto en el metabolismo fotosintético en Tp, pero sí afectó a Ac. La A de Ac fue aproximadamente un 25% inferior en mezcla que en monocultivo en ambos días de medida (Figs. 5.1A y 5.2A). A pesar de un ligero descenso de la g_s en el día 16 en mezcla, la C_i no se vio alterada en ninguno de los días analizados (Figs. 5.1 y 5.2), por lo que se podría descartar una limitación estomática de la fotosíntesis.

En cambio, sí se observó un descenso del qP , del Φ_{PSII} y del ETR en mezcla (Figs. 5.7 y 5.8). Como se verá en el capítulo 7, la toma de nitrógeno de Ac en mezcla fue inferior que cuando creció en monocultivo (Tablas 7.8 y 7.9), lo que disminuyó el nitrógeno disponible. Esto provocó que la concentración de proteínas se redujera, lo que podría implicar que hubiera una menor concentración de proteínas involucradas en los procesos de transporte de energía y/o en las enzimas del ciclo de Calvin.

Así pues, el menor transporte de electrones podría atribuirse a la menor concentración de proteínas observadas en Ac en mezcla (Figs. 7.5B y 7.6B), dificultándose, de esa forma, el correcto funcionamiento de los sistemas de transducción de la energía en los fotosistemas. La menor proporción de electrones destinados a procesos fotoquímicos (qP) podría implicar una menor producción de NADPH y ATP para su uso en el ciclo de Calvin.

5.3.3. Efecto del CO_2 en condiciones de buen aporte hídrico

Cuando las plantas bajo buen aporte hídrico fueron sometidas a un aumento de la concentración de CO_2 , la A presentó un incremento en ambas especies (Figs. 5.1A y 5.2A), debido principalmente al incremento de la disponibilidad de CO_2 en los cloroplastos, como también observaron Lee et al. (2011) en 10 especies pratenses. La concentración actual de CO_2 en la atmósfera no satura la enzima Rubisco, por lo que un

aumento en la concentración de CO₂ en las plantas provocaría una mayor actividad Rubisco y, por tanto, una mayor fijación de CO₂. Además de este efecto directo de la mayor concentración de CO₂ sobre la actividad Rubisco, el elevado CO₂ también aumenta la *A* de manera indirecta al disminuir la fotorrespiración, debido a que la mayor relación CO₂/O₂ disminuye la función de oxigenación de la Rubisco (Drake et al., 1997).

Paralelamente a la mayor *A*, se observó una menor *g_s*, entre un 35 y un 40% en ambas especies (Figs. 5.1B y 5.2B), como también observaron Lee et al. (2011), en magnitudes similares, en especies pratenses. El mecanismo por el cual el CO₂ provoca el cierre estomático todavía no está del todo clarificado (Schwartz et al., 1988; Assmann, 1993; Webb et al., 1996; Schroeder et al., 2001; Zeiger et al., 2002; Young et al., 2006; Azoulay-Shemer et al., 2015; Chater et al., 2015).

Esta menor *g_s* conllevó una menor tasa de transpiración instantánea (*E*) que, junto a la mayor *A*, permitió a ambas especies incrementar su eficiencia instantánea en el uso del agua (*ITE*), indicando que, bajo condiciones de elevado CO₂, las plantas son más eficientes y necesitan una menor cantidad de agua para producir la misma cantidad de biomasa que bajo condiciones de CO₂ ambiental. Similares resultados han sido obtenidos por varios autores (Eamus, 1991; Saxe et al., 1998; Robredo et al., 2007; Pérez-López et al., 2013b).

Diversos autores han afirmado que el efecto del aumento de la concentración externa de CO₂ sobre la *A* es transitorio, es decir, la fotosíntesis se aclimata, debido a su regulación a la baja por la falta de sumideros para el CO₂ extra fijado (Stitt & Krapp, 1999; Ainsworth et al., 2003). Sin embargo, otros investigadores no observaron aclimatación de la *A* (Rogers et al., 1998; Robredo et al., 2007) en plantas crecidas a elevado CO₂ con una concentración alta de nitrógeno. Ainsworth & Long (2005) han propuesto que las plantas crecidas bajo alta disponibilidad de nitrógeno se verían menos afectadas por la aclimatación, ya que pueden mantener un mejor equilibrio entre carbono y nitrógeno, y mantener, de esta manera, sumideros para los fotoasimilados.

En este estudio no se observó aclimatación de la *A* en ninguna de las especies, manteniéndose ésta constante a lo largo de todo el experimento, aunque sí se observó una menor actividad de la enzima Rubisco (Tablas 5.1 y 5.2), posiblemente debido a una disminución en la cantidad de enzima. Como se ha mencionado anteriormente, la mayor concentración de CO₂ aumenta la eficiencia de la Rubisco, por lo que la actividad Rubisco deja de ser limitante para la fijación y se convierten en limitantes la regeneración de la RuBP y el uso del CO₂ fijado. Este hecho provoca que al no ser necesaria tanta concentración de enzima, las plantas redirigen el N hacia otros compuestos como pueden ser pigmentos y otras proteínas. La concentración de pigmentos se mantuvo constante en ambas especies y en ambos días analizados. Del mismo modo, se mantuvo constante la concentración de proteínas en *Ac* tanto el día 9 como el día 16, pero sólo el día 9 en el caso de *Tp*. Tales hechos indican que, a pesar del mayor crecimiento y la menor concentración de nitrógeno en hoja, la planta aumentó su síntesis para equilibrarla con el aumento de crecimiento. Esto podría estar relacionado con la capacidad de ambas especies de evitar la aclimatación. En cambio, la concentración de proteínas disminuyó el día 16 en *Tp* con respecto a plantas crecidas a CO₂ ambiental pudiendo ser debido a un efecto dilución por la acumulación de almidón y otros azúcares.

Además, *Tp* aumentó el uso de las triosas fosfato, como ya observaron en cebada a CO₂ elevado Robredo et al. (2010), incrementando la concentración de sacarosa y de almidón (Figs. 5.9 y 5.10). Estos compuestos son considerados posibles sumideros para mantener la *A* a elevado CO₂ (Wolfe et al., 1998), ya que permiten disminuir la concentración de 3PGA en el cloroplasto y mantener una actividad alta del ciclo de Calvin para regenerar el ATP y el NADPH obtenidos en la fotosíntesis, y así evitar una inhibición por producto. Sin embargo, Nakano et al. (2000) afirmaron que una alta concentración de almidón podría disminuir la difusión de CO₂ en los cloroplastos.

5.3.4. Efecto de la sequía bajo CO₂ ambiental

En el estudio de sequía progresiva sólo se detectaron cambios en la tasa fotosintética de Tp en monocultivo (Fig. 5.1A), lo que se encuentra en concordancia con lo registrado en las relaciones hídricas (capítulo 4), donde se observó que éste fue el tratamiento más afectado por la sequía en el día 9. En mezcla, donde el contenido de agua en el suelo se redujo hasta un 33% con respecto al control (Fig. 4.1), se observaron descensos en la g_s , tanto en Ac como en Tp, que provocaron una ligera disminución en la C_i en ambas especies, aunque no se tradujo en una reducción significativa de la A .

El menor contenido de agua en el suelo en el tratamiento de Tp en monocultivo que en el de mezcla (Fig. 4.1) propició una mayor respuesta de la g_s en Tp en monocultivo para disminuir la pérdida de agua (Fig. 5.1B), ya que como se ha visto en el capítulo 4, la transpiración está ligada a la g_s . Este cierre estomático limitó la entrada de CO₂ a los cloroplastos, reduciendo la C_i y, de este modo, disminuyendo la disponibilidad de CO₂ para la enzima Rubisco. Los procesos fotoquímicos de transporte de la energía no se encontraron alterados (Fig. 5.7) y tampoco la concentración de pigmentos (Fig. 5.5), por lo que la limitación de la A fue principalmente estomática, aunque, con los análisis realizados, no se pueda descartar una limitación bioquímica, ya que se observó un descenso de la actividad Rubisco (Tabla 5.1). Esto corrobora lo observado por Flexas et al. (2002), quienes afirmaron que cuando la sequía no es severa la fotosíntesis disminuye principalmente por una limitación difusional.

El efecto de la sequía sobre la A fue menor que sobre la E , lo que permitió a Tp aumentar su ITE indicando que es una especie eficiente en el uso del agua bajo condiciones de estrés. Estos resultados también han sido observados por otros autores en especies pratenses de montaña (Brilli et al., 2011).

La menor fijación de CO₂ tuvo como consecuencia una menor síntesis de almidón como también observaron Vasey & Sharkey (1989). Sin embargo, otros azúcares como la glucosa y la fructosa aumentaron su concentración (Fig. 5.9A-B), como también observaron Pelleschi et al. (1997), Marques da Silva & Arrabaça (2004) y Lee et al.

(2008). No está claro si este incremento en la concentración de azúcares solubles como la glucosa y la fructosa es debido a una acumulación por una menor tasa de transporte de azúcares (Pelleschi et al., 1997) o a una mayor degradación del almidón (Correia et al., 2006; Lee et al., 2008). En nuestro estudio podrían estar dándose ambas circunstancias, ya que aunque la concentración de almidón es menor en plantas en sequía, la concentración de sacarosa no aumenta y sólo lo hace la de glucosa y fructosa.

En el estudio de sequía homogénea se observaron diferencias en el comportamiento entre especies, a pesar de contar todas con la misma disponibilidad de agua en el suelo.

En Tp no se observaron diferencias entre los tipos de competencia, lo que indicaría que cuando el contenido de agua en el suelo es similar entre tratamientos, el tipo de competencia no afecta al metabolismo fotosintético de Tp.

Además de la limitación estomática a la fotosíntesis observada en el día 9, en el día 16 también ocurrieron limitaciones bioquímicas y fotoquímicas, como también apuntaron varios autores cuando la sequía se hace más severa (Flexas et al., 2002).

Por un lado, la actividad Rubisco disminuyó (Tabla 5.2), lo que indicaría una posible limitación bioquímica de la fotosíntesis. Lawlor & Tezara (2009) atribuyeron la caída de la actividad Rubisco al descenso de la concentración de ATP y a la menor actividad Rubisco activasa, sin embargo, en este estudio no se observó un descenso del estado de activación de la enzima en Tp. Otros autores indicaron que el hecho de que la actividad máxima de la Rubisco disminuyera podría indicar daños irreversibles a la Rubisco (Parry et al., 2002) o una menor cantidad de enzima debido a una menor síntesis (Majumdar et al., 1991; Vu et al., 1999).

Por otro lado, las concentraciones de clorofila *a* y *b* y de carotenoides se redujeron (Fig. 5.6). Este descenso en la concentración de pigmentos podría ser debido a una mayor actividad clorofilasa (Majumdar et al., 1991; Loggini et al., 1999), que podría considerarse un indicador de tolerancia de Tp a la sequía para reducir la energía captada

y evitar daños sobre los fotosistemas (Munné-Bosch & Alegre, 2000; Galmés et al., 2007; Elsheery & Cao, 2008).

Además de una menor cantidad de energía captada por los sistemas antena, la eficiencia fotoquímica se vio alterada, observándose descensos en el F_v/F_m' , el qP , el Φ_{PSII} y el ETR (Fig. 5.8). Debido a que la tasa fotosintética está reducida y hay un menor consumo de ATP y NADPH, Tp reduce su tasa de transporte de electrones para reducir el desequilibrio entre la producción y consumo de poder reductor. Ya que si existe dicho desequilibrio, la planta podría sufrir daño oxidativo (Pérez-López et al., 2012). La especie Tp disipó la energía en forma de calor a través del aumento del NPQ (Fig. 5.8F), hecho que está considerado también como un rasgo de tolerancia a la sequía, al aumentar la fotoprotección sobre el PSII (Flexas & Medrano, 2002b). Sin embargo, que el valor de F_v/F_m se mantuviera constante indica que la sequía no afectó a la integridad estructural de la maquinaria fotosintética (Robredo et al., 2010).

La respuesta de los azúcares fue similar a la registrada en el periodo de sequía progresiva, es decir, se observó una menor concentración de almidón debido a una menor síntesis y/o a su degradación en otros azúcares. Por tanto, se registró una acumulación de glucosa y fructosa, acompañada también por sacarosa (Fig. 5.10) para actuar, como se ha mencionado en el capítulo 4, como compuestos osmoprotectores (Tabla 4.4A).

Tal y como ocurrió el día 9, en el día 16, Tp aumentó su ITE (Fig. 5.2F) en ambos tipos de competencia en magnitudes similares, indicando, de nuevo, que Tp es más eficiente en el uso del agua cuando está en sequía, como también han observado otros autores en especies pratenses (Brilli et al., 2011).

En el caso de Ac, como ocurrió en Tp, la menor disponibilidad de agua en el suelo provocó cierre estomático que se tradujo en una menor entrada de CO_2 a las hojas. Sin embargo, se detectaron diferencias en los valores de C_i entre monocultivo y mezcla, a pesar de observarse valores similares de g_s . Esto podría ser debido a que la menor A registrada en mezcla disminuiría el consumo de CO_2 y éste tendería a acumularse y, por eso, el valor de C_i en mezcla fue mayor. Esto pondría de manifiesto que, además de la

limitación difusional por descenso de la g_s , existen otras limitaciones no estomáticas al menos cuando Ac creció en mezcla.

De hecho, se observó que la eficiencia fotoquímica disminuyó en ambos tipos de competencia, aunque de manera más severa en mezcla, posiblemente debido a que una mayor proporción de los aceptores de electrones se encontraban reducidos por descenso de las tasas de consumo de NADPH y ATP (Robredo et al., 2010). Como vimos en el capítulo 4, Ac se vio más afectada por la sequía en mezcla, lo que avalaría estos resultados. Además de esta limitación fotoquímica, también se observó una limitación bioquímica en mezcla como se deduce del descenso de la actividad Rubisco (Tabla 5.2).

Como ocurrió en Tp, Ac aumentó su *ITE* cuando fue sometida a sequía por un mayor descenso de la *E* que de la *A*. Este comportamiento fue observado en otras gramíneas en condiciones de sequía (Robredo et al., 2007).

Cuando Ac creció en monocultivo se registró una degradación del almidón, observándose un descenso en el contenido de almidón por planta entre los días 9 y 16. Sin embargo, no se registró un aumento de los azúcares solubles (Fig. 5.10), lo que indicaría que los esqueletos carbonados fueron utilizados en la respiración para la obtención de energía para procesos como la osmorregulación o el sistema antioxidante (Pérez-López et al., 2012). En cambio, cuando creció en mezcla, no se degradó almidón, pero, sin embargo, sí se acumuló glucosa, pudiendo indicar que la glucosa actuó como compuesto osmoregulador (Tabla 4.4B).

5.3.5. Efecto de la sequía bajo CO₂ elevado

Bajo condiciones de elevado CO₂, en el estudio de sequía progresiva, Tp respondió a la falta de agua en el suelo cerrando los estomas, que es una de las primeras respuestas de las plantas a la sequía (Medrano et al., 1997). El contenido de agua en el suelo del tratamiento de monocultivo fue similar entre concentraciones de CO₂ y, por

ello, la respuesta estomática fue similar en ambas concentraciones de CO₂. En cambio, cuando Tp creció en mezcla, el menor contenido de agua en el suelo con respecto a las plantas crecidas a CO₂ ambiental (Fig. 4.1) debido a la mayor transpiración acumulada, provocó una mayor respuesta estomática al déficit hídrico. A pesar de la menor *g_s* a CO₂ elevado que a CO₂ ambiental, la *C_i* fue superior que a CO₂ ambiental, gracias a la mayor concentración externa de CO₂, llegando a ser equivalente a la registrada a CO₂ ambiental en plantas bajo buen aporte hídrico (Fig. 5.1C). La mayor difusión de CO₂ a los cloroplastos permitió mitigar parcialmente la limitación estomática observada sobre la fotosíntesis, llegando a ser la *A* similar a la registrada por las plantas bajo buen aporte hídrico a CO₂ ambiental, como también observaron Robredo et al. (2007). Al presentar una menor *E*, debido a la menor conductancia estomática, y una mayor *A*, la *ITE* aumentó notablemente (Fig. 5.1); ambos aspectos fueron también observados por Eamus (1991). Tal y como ocurrió a CO₂ ambiental en el día 9, a elevado CO₂ no se observaron diferencias ni en la concentración de pigmentos (Fig. 5.5) ni en la transducción de la energía (Fig. 5.7), de lo que podríamos deducir que tanto estructural como funcionalmente los fotosistemas no estarían afectados.

Las mayores tasas fotosintéticas permitieron una mayor disponibilidad de carbohidratos, en comparación con CO₂ ambiental, lo que se tradujo en una mayor concentración de azúcares solubles que permitieron, como ha sido detallado en el capítulo 4, un mayor ajuste osmótico (Tabla 4.2A). A elevado CO₂, la concentración de almidón no descendió, por lo que la hipótesis postulada a CO₂ ambiental de que la mayor concentración de azúcares solubles era debida a una degradación del almidón no se cumpliría, indicando, por tanto, una mayor síntesis de azúcares solubles a elevado CO₂ o un menor consumo o tasa de transporte, con la consecuente acumulación (Munns, 1988; Pelleschi et al., 1997).

En el caso de Ac el efecto de la sequía fue dependiente del tipo de competencia; así, cuando Ac creció en monocultivo no vio alterada su tasa fotosintética, pero sí cuando lo hizo en mezcla. Esta diferencia puede atribuirse a que el contenido de agua en el suelo en monocultivo fue mayor que en mezcla (Fig. 4.1). La menor disponibilidad de agua puede afectar a la capacidad fotosintética a través de diferentes mecanismos. Por un lado, la sequía puede afectar a la capacidad de las plantas para captar la radiación,

alterando los sistemas antena a través, por ejemplo, de la disminución de los pigmentos fotosintéticos. Sin embargo, este no parece ser el caso, ya que no se observaron diferencias en los mismos, como tampoco se observaron en los parámetros de fluorescencia. Por otro lado, como ha sido mencionado anteriormente, uno de los primeros mecanismos de las plantas ante el estrés hídrico es el cierre estomático que conlleva una menor entrada de CO_2 a las hojas (Fig. 5.1C). Por lo tanto, la menor A podría deberse a una limitación estomática. Adicionalmente, la fotosíntesis puede verse afectada a través de una limitación bioquímica, por una menor actividad Rubisco o por unas menores tasas de regeneración de la RuBP (Flexas & Medrano, 2002a). El hecho de que la C_i presente unos valores altos comparativamente con una g_s muy baja (Fig. 5.2B-C) podría apuntar en este sentido. No se vieron diferencias en la actividad Rubisco, por lo que la limitación bioquímica podría ser a nivel de regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato. Por otro lado, se observó un elevado estado de activación, lo que podría deberse a una estrategia de la planta para que, aunque exista una reducción en la cantidad de enzima Rubisco, como se puede deducir de la menor concentración de proteínas (Fig. 7.5B), ésta esté altamente activa y no se convierta en un factor limitante en la fotosíntesis.

En el estudio de sequía homogénea, Tp, en ambos tipos de competencia, mostró la misma tendencia de descenso de la A a elevado CO_2 que a CO_2 ambiental, sin embargo, la A fue mayor a CO_2 elevado que a CO_2 ambiental (Fig. 5.2A). Analizando las correlaciones entre la A y el Ψ_{wmd} (Fig. 5.3A) y entre la A y la g_s (Fig. 5.3B) se puede deducir que el efecto del CO_2 sobre la A no es por una mejor regulación estomática o un mejor estado hídrico, sino que sería por algún otro factor, como podría ser la mayor C_i (Fig. 5.2C). La mayor concentración externa de CO_2 facilitó una mayor difusión de CO_2 a los cloroplastos, lo que permitió que la C_i fuera superior que a CO_2 ambiental, aliviando parcialmente la limitación estomática sobre la fotosíntesis, al igual que ocurrió en el día 9. Ni los parámetros de fluorescencia (Fig. 5.8) ni la actividad Rubisco (Tabla 5.2) presentaron diferencias entre ambas concentraciones de CO_2 , por lo tanto, se puede descartar que la mejora de la tasa fotosintética del trébol bajo estrés hídrico crecido a elevado CO_2 sea debida a unas menores limitaciones bioquímicas o fotoquímicas. Gracias a la mayor A registrada a elevado CO_2 , en comparación con CO_2 ambiental, y a la menor E (Fig. 5.2), la ITE aumentó en las plantas sometidas a la acción combinada de

sequía y elevado CO₂, indicando que cuando las plantas crecen a elevado CO₂ son más eficientes en el uso del agua que cuando lo hacen a CO₂ ambiental.

La concentración de almidón disminuyó considerablemente con respecto al día 9 en plantas ya en sequía, apuntando claramente a un proceso de degradación del almidón, ya que, además, si se analiza el contenido de almidón por planta, el valor del día 9 es superior al del día 16. Sin embargo, la mayor degradación de almidón no está correlacionada con un incremento en proporción similar de los azúcares solubles, lo que indicaría que los carbohidratos son destinados a aumentar las tasas de respiración, permitiendo a la planta realizar un mayor ajuste osmótico (Tabla 4.4A). Un aumento de las tasas de respiración en plantas sometidas a estrés hídrico a elevado CO₂ con respecto a CO₂ ambiental ha sido observado por algunos autores (Pérez-López et al., 2013a; Gauthier et al., 2014).

En el caso de Ac, el efecto de la sequía junto con el elevado CO₂ fue dependiente del tipo de competencia. Cuando Ac creció en monocultivo el elevado CO₂ mitigó parcialmente los efectos negativos de la sequía, como también observaron Robredo et al. (2007). A pesar de contar con la misma disponibilidad de agua en el suelo, cuando las plantas crecieron bajo elevado CO₂ cerraron menos los estomas, reduciendo la limitación estomática, además de que, gracias a la mayor concentración externa de CO₂, la entrada de CO₂ fue mayor y la *Ci* superior. Esta mayor *A*, debida en parte a una mejor regulación estomática, fue confirmada con la ANCOVA entre la *A* y la *g_s* (Fig. 5.4B). Además, se observó una mayor actividad Rubisco que a CO₂ ambiental, lo que aumentaría las tasas de regeneración del NADPH y ATP, lo que permitiría, además, mantener unas tasas de transporte de electrones elevadas y así presentar una mayor *A* que a CO₂ ambiental, ya que a CO₂ ambiental se observó un descenso en el transporte de electrones (Fig. 5.8) que no se registró a elevado CO₂.

Como también se ha observado en Tp, la *ITE* de Ac aumentó cuando creció en monocultivo bajo elevado CO₂ y sequía (Fig. 5.2F), gracias a una mayor reducción de la *E* que de la *A*.

Como se ha hipotetizado en el capítulo 4, cuando Ac creció en mezcla, la menor biomasa radical con respecto a Tp redujo su capacidad para la toma de agua. Este hecho fue acrecentado a elevado CO_2 porque la biomasa radical de Tp se vio más favorecida por el aumento del CO_2 que la de Ac y, por tanto, Ac presentó un metabolismo fotosintético más deficiente. La A fue menor, aunque no significativamente, que a CO_2 ambiental, a pesar de disponer de una mayor cantidad de CO_2 . En estas condiciones el parámetro F_v/F_m descendió a 0,72 lo que indicaría que el aparato fotoquímico presentó daño (Kadir et al., 2007). Otros autores también han afirmado que el F_v/F_m sólo desciende en condiciones de déficit hídrico severo (Lawlor & Cornic, 2002; Centritto, 2005), sugiriendo que la actividad del PSII es resistente al déficit hídrico (Tezara et al., 2008). Este daño iría acompañado por una menor capacidad de transferir los electrones desde los centros de reacción de los fotosistemas al aceptor final, lo que se traduciría en una menor generación de NADPH y ATP (Fig. 5.8), lo que en último término podría suponer una disminución de la actividad del ciclo de Calvin. Al no disponer de los sustratos necesarios para la regeneración de la RuBP, la Rubisco se inhibiría (Tabla 5.2), descendiendo por tanto la fijación de CO_2 . Prueba de ello es que la C_i aumentó por encima del valor de las plantas crecidas bajo buen aporte hídrico (Fig. 5.2C).

Dada la baja capacidad de transferir la energía captada por los pigmentos y la baja capacidad de dispersión de esta energía en forma de calor (Fig. 5.8F), Ac, para atenuar el riesgo de daño fotooxidativo, redujo la concentración de pigmentos (Fig. 5.6) disminuyendo así la captación de energía. La concentración de clorofila b descendió más que la de clorofila a , lo que indicaría que la planta está disminuyendo el tamaño de sus complejos antena, captando de esa manera menos energía.

En el caso de Ac en mezcla y en condiciones de sequía, la ITE fue similar a elevado CO_2 que a CO_2 ambiental (Fig. 5.2F). A pesar de que la E disminuyó ligeramente con respecto a las plantas crecidas a CO_2 ambiental (Fig. 5.2E), como la fotosíntesis fue menor (aunque no significativamente) que a CO_2 ambiental (Fig. 5.2A), la ITE fue similar entre concentraciones de CO_2 , indicando que Ac no es más eficiente en el uso del agua cuando crece en mezcla a elevado CO_2 y en sequía.

5.4. Conclusions

- Under well-watered conditions at ambient CO₂, the photosynthetic rate of Tp was higher than the one of Ac due to a higher Rubisco activity in the former.
- Under well-watered conditions, the competition between Tp and Ac provoked a lower photosynthetic capacity of Ac due to a lower electron transport rate.
- Elevated CO₂ increased photosynthetic rate of both species through higher CO₂ input into the chloroplasts. Acclimation was not observed in any species thanks to the appearance of sinks for the extra CO₂.
- Elevated CO₂ decreased stomatal conductance, which permitted to reduce the transpiration rate, and, together with the higher photosynthetic rate, allowed both species to increase water use efficiency.
- Drought at ambient CO₂, on day 9, decreased only the photosynthetic rate of Tp in monoculture, mainly by a stomatal limitation, although a biochemical limitation was also observed.
- In the homogeneous drought period, at ambient CO₂, the photosynthetic rate of Tp decreased in both types of competition through stomatal and non-stomatal limitations. In the case of Ac, differences depending on the type of competition were observed because, in mixture, in addition to the stomatal and photochemical limitations observed in monoculture, biochemical limitations were registered.
- The elevated CO₂ alleviated the stomatal limitation caused by drought on day 9 in the monoculture of Tp, therefore, the photosynthetic rate was higher than at ambient CO₂ as well as the water use efficiency.

- At elevated CO₂, progressive drought affected plants in mixture because the higher cumulative transpiration per pot decreased soil water content, in consequence of which, the photosynthetic rates of Tp and Ac decreased by stomatal limitation and, in the case of Ac, also by biochemical limitation.
- In the homogeneous drought period, the elevated CO₂ improved the photosynthetic rate of Tp in both types of competition and the one of Ac in monoculture compared to plants grown at ambient CO₂ due to the higher CO₂ concentration in the leaves, which permitted an increase in water use efficiency.
- In mixture at elevated CO₂ on day 16, the lower competitiveness of Ac for water uptake, compared to Tp, caused Ac to present a similar photosynthetic rate than at ambient CO₂, despite the higher external CO₂ concentration, since Ac suffered stomatal, photochemical, and biochemical limitations which were not counteracted by elevated CO₂.
- The type of competition did not affect the photosynthetic metabolism of Tp after 16 days of drought, when the soil water content was similar between treatments, regardless of the CO₂ concentration.

6. Metabolismo antioxidante

6.1. Introducción

El término estrés oxidativo carece de una definición precisa, si bien, todas las definiciones comparten cuatro puntos: 1) el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS); 2) la posibilidad de oxidaciones descontroladas debido a que la tasa de generación de ROS es superior a su metabolización; 3) el daño oxidativo sobre componentes celulares, implicando que la tasa de oxidación es superior a la de reparación; 4) la pérdida de función y, en último término, la muerte celular por la acumulación de daño celular (Foyer & Noctor, 2011).

Cuando existe un desequilibrio entre la producción de NADPH y su consumo, disminuye la disponibilidad de NADP^+ para la oxidación de la ferredoxina que es el último componente de la cadena transportadora de electrones tilacoidal. En esta circunstancia, el resto de los componentes de la cadena transportadora están en la forma reducida al no poder ceder su energía al siguiente compuesto, provocando que, en el caso de que la captación de energía lumínica se mantenga constante, la clorofila excitada en los centros de reacción no pueda ceder su energía y lo haga al oxígeno, con la consiguiente formación del oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). Alternativamente, para poder mantener el transporte de electrones y evitar la formación de $^1\text{O}_2$, la energía de la ferredoxina se transfiere al oxígeno mediante la reacción de Mehler, formando el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), que es menos tóxico que el $^1\text{O}_2$. El $\text{O}_2^{\cdot-}$ en presencia de metales pesados y a través de las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss se convierte en otros radicales como el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), que es más tóxico para la planta (Burkitt & Gilbert, 1990; Asada, 1999; Giorgio et al., 2007). Las ROS, como el $^1\text{O}_2$, el $\text{O}_2^{\cdot-}$, el OH^{\cdot} y el H_2O_2 , son moléculas de oxígeno inestables que pueden oxidar moléculas como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos provocando el denominado daño oxidativo (Foyer et al., 1994).

Los mecanismos que tienen las plantas para hacer frente a la producción de las ROS se divide principalmente en dos grupos: por un lado, el mecanismo enzimático y, por otro lado, el no enzimático; si bien, ambos mecanismos están interconectados (Fig. 6.1).

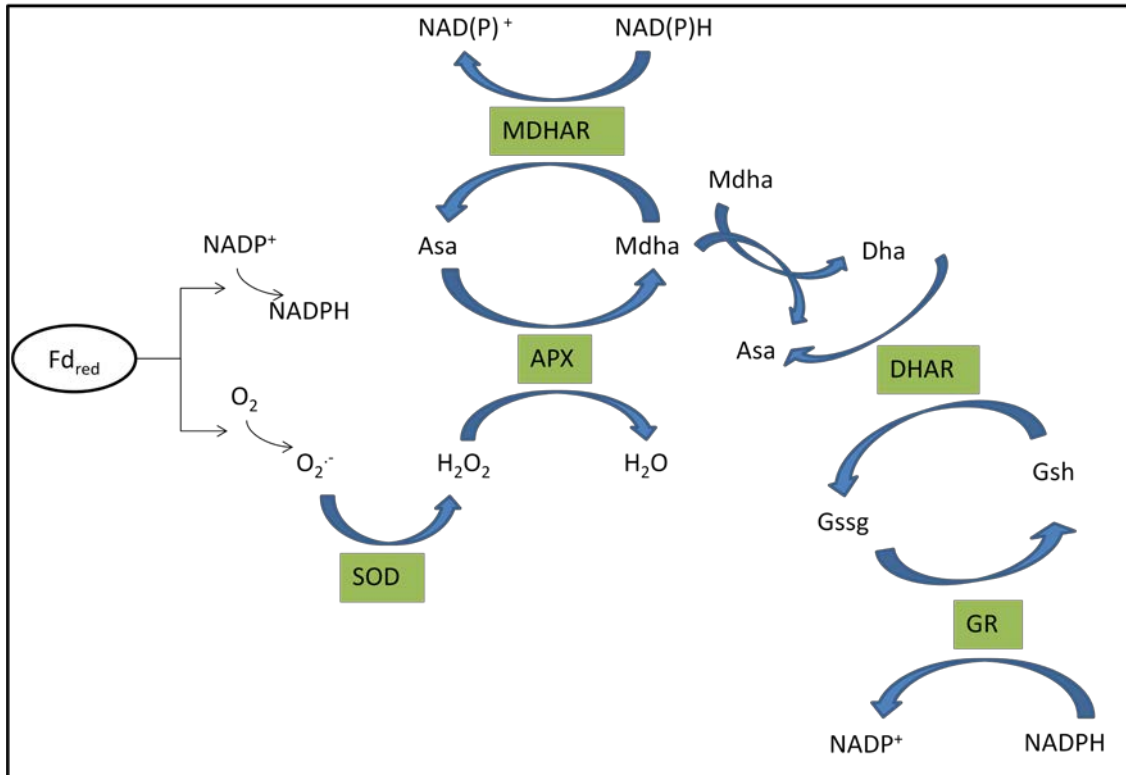


Fig. 6.1. Schematic illustration of the enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems. APX: ascorbate peroxidase; Asa: reduced ascorbate; Dha: dehydroascorbate; DHAR: dehydroascorbate reductase; Fd_{red}: reduced ferredoxin; GR: glutathione reductase; Gsh: reduced glutathione; Gssg: oxidized glutathione; H₂O₂: hydrogen peroxide; MDHA: monodehydroascorbate; MDHAR: monodehydroascorbate reductase; O₂⁻: singlet oxygen; SOD: superoxide dismutase.

Uno de los primeros mecanismos que tienen las plantas para metabolizar y detoxificar el O₂⁻ es su eliminación a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD) que convierte el O₂⁻ en H₂O₂, el cual es menos tóxico para la planta y tiene una vida media superior que el anterior (Giorgio et al., 2007). Sin embargo, el H₂O₂ sigue siendo tóxica para la planta ya que inactiva el metabolismo fotosintético y activa las rutas respiratorias (Kaiser, 1979; Charles & Halliwell, 1980); por tanto, tiene que ser de igual manera detoxificada. Dentro del conocido como ciclo ascorbato-glutatiión o ruta

Halliwell-Asada, la enzima ascorbato peroxidasa (APX) utiliza el poder reductor del ascorbato (Asa) para convertir el H_2O_2 en H_2O y el Asa en el radical monodehidroascorbato (Mdha).

Para que este ciclo funcione correctamente el Asa ha de regenerarse y para ello la planta tiene dos opciones: por un lado, la enzima monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) que utiliza NADH o NADPH en el proceso y, por otro lado, la conversión espontánea del Mdha en dehidroascorbato (Dha) (Smirnoff, 2000), enlazando posteriormente con la actividad de la enzima dehidroascorbato reductasa (DHAR) que convierte el Dha en Asa. Esta enzima utiliza el glutatión reducido (Gsh) como molécula donadora de electrones oxidándose a glutatión oxidado (Gssg). Finalmente, la enzima glutatión reductasa (GR) reduce el Gssg utilizando el poder reductor del NADPH generando Gsh.

Además de la participación del Asa y Gsh a través del ciclo Halliwell-Asada en la detoxificación del $\text{O}_2^{\cdot -}$ y, debido al poder de oxidorreducción de estas moléculas, también pueden actuar directamente sobre los radicales libres (Knox & Dodge, 1985; Triantaphylidès & Havaux, 2009; Galano & Alvarez-Idaboy, 2011).

Aparte de esta vía de producción de ROS, la enzima Rubisco está implicada en la generación de H_2O_2 en los peroxisomas (Foyer & Noctor, 2000). Cuando la relación CO_2/O_2 en los cloroplastos es baja, la actividad oxigenasa de la Rubisco se incrementa, generándose en los peroxisomas H_2O_2 cuando el glicolato se convierte en glioxalato a través de la enzima glicolato oxidasa. El H_2O_2 generada es detoxificada por la enzima catalasa (CAT) (Willekens et al., 1995).

Cuando las plantas crecen bajo elevado CO_2 , la mayor tasa de fijación de CO_2 aumenta el consumo de NADPH lo que aumenta la disponibilidad de NADP^+ en el cloroplasto, disminuyendo la potencialidad de aparición de ROS (Marabottini et al., 2001). Además, como se ha mencionado en el capítulo 5, la mayor relación CO_2/O_2 reduce la fotorrespiración, lo que haría descender la tasa de generación de H_2O_2 asociada a la misma (Polle et al., 1993; Azevedo et al., 1998). Sin embargo, la influencia del aumento de CO_2 sobre la actividad de las enzimas y la concentración de

los metabolitos implicados no está clara, habiéndose detectado tanto aumentos como descensos (Badiani et al., 1993; 1998; Polle et al., 1993; Polle, 1996; Schwanz et al., 1996a,b,c; Sanità di Toppi et al., 2002; Erice et al., 2007; Pérez-López et al., 2009b; 2010b).

En el capítulo 5 se mencionó que la sequía provoca cierre estomático lo que disminuye la disponibilidad de CO₂ en el cloroplasto, reduciéndose la fijación de CO₂ y, por tanto, el consumo de NADPH. Si la planta no es capaz de disminuir la llegada de energía a las clorofilas de los centros de reacción, por ejemplo, mediante mecanismos de emisión de fluorescencia o de disipación térmica, la cadena de transporte de electrones tilacoidal se sobrerreduce, desencadenándose el proceso comentado al inicio de esta sección, es decir, el paso del exceso de energía presente en la cadena transportadora de electrones de la ferredoxina al O₂ en la reacción de Mehler formándose O₂^{-•} (Sgherri & Pérez-López, 2013). Además, Galmes et al. (2007) observaron un aumento de la fotorrespiración en condiciones de sequía debido a un descenso de la concentración interna de CO₂, lo que favorece la reacción oxigenasa de la Rubisco, que provocaría una mayor generación de H₂O₂ en los peroxisomas. Foyer & Harbinson (1994) afirmaron que la reacción de Mehler y la fotorrespiración son importantes vías metabólicas para la disipación de la energía lumínica en los casos en los que la entrada de CO₂ en las hojas de plantas herbáceas se ve reducida por la sequía. Para hacer frente al incremento de la generación de ROS bajo condiciones de estrés hídrico, las plantas tienden a aumentar la concentración de los metabolitos antioxidantes y la actividad de las enzimas implicadas en la metabolización de las ROS (Zhang & Kirkham, 1994; Mittler, 2002), aunque el grado de incremento de los sistemas antioxidantes varía enormemente entre especies e incluso dentro de una misma especie entre cultivares (Reddy et al., 2004). AbdElgawad et al. (2015) observaron, en un estudio comparativo entre gramíneas y leguminosas, que estas últimas se vieron más afectadas por la sequía atendiendo a indicadores del metabolismo antioxidante como la peroxidación lipídica y la acumulación de H₂O₂.

Cuando la sequía va acompañada de un aumento de la concentración de CO₂, tal y como se ha descrito en el capítulo 5, varios autores han observado que la reducción de la fijación de CO₂ es menor que bajo condiciones de sequía y CO₂ ambiental (Robredo

et al., 2007). Bajo esta premisa, la tasa de consumo del NADPH sería más alta y, por tanto, la planta dispondría de mayor cantidad de NADP^+ que es el último aceptor de electrones de la cadena transportadora tilacoidal, reduciéndose la generación de ROS (Farfan-Vignolo & Asard, 2012). Además, varios estudios han observado que la mayor disponibilidad de esqueletos carbonados a elevado CO_2 permite a las plantas poseer un sistema antioxidante más desarrollado en condiciones de estrés hídrico (Schwanz et al., 1996b; Marabottini et al., 2001; Pérez-López et al., 2013b). Farfan-Vignolo & Asard (2012) observaron un menor daño oxidativo en plantas de pastizales creciendo en sequía a elevado CO_2 que a CO_2 ambiental, pero no detectaron una inducción del sistema antioxidante, afirmando que el efecto beneficioso del elevado CO_2 se debía a una menor generación de ROS, más que a una más eficiente eliminación de las mismas. Por otro lado, AbdElgawad et al. (2015) demostraron que el efecto beneficioso del elevado CO_2 en condiciones de sequía variaba entre gramíneas y leguminosas.

Existen algunos estudios que abordan el metabolismo antioxidante en comunidades de plantas bajo condiciones climáticas futuras (Naudts et al., 2014); sin embargo, hasta la fecha, no existe ningún trabajo que estudie el efecto que tiene la competencia en la respuesta antioxidante de plantas al aumento de la concentración de CO_2 y la sequía.

El objetivo general de este capítulo es determinar el efecto de la sequía, el elevado CO_2 y la competencia sobre el metabolismo antioxidante de *Agrostis capillaris* y *Trifolium pratense*. Para ello, hemos dividido este objetivo en cinco objetivos parciales:

- Conocer el efecto que tiene el aumento de la concentración de CO_2 en el metabolismo antioxidante de las dos especies pratenses en condiciones de buen aporte hídrico.
- Estudiar el impacto de la sequía sobre el metabolismo antioxidante y determinar si existen diferencias entre las especies cuando son sometidas a un mismo periodo de sequía (sequía progresiva).
- Examinar el metabolismo antioxidante y las posibles diferencias sobre las dos especies cuando el nivel de sequía es idéntico en todos los tratamientos (sequía homogénea).

- Determinar la posible interacción entre la sequía y el aumento de la concentración de CO₂ en el metabolismo antioxidante, tanto en sequía progresiva como homogénea.
- Analizar el papel que juega el tipo de competencia al que son sometidas las plantas en la respuesta de las especies al aumento del CO₂, la sequía y su interacción en los procesos del metabolismo antioxidante.

Ante tales objetivos, las hipótesis de partida son: 1) el elevado CO₂ *per se*, gracias a la mayor actividad fotosintética, permitirá una mayor síntesis de los metabolitos antioxidantes y unas actividades enzimáticas superiores; sin embargo, debido a la menor generación de ROS por el mayor consumo de NADPH, se producirá un "efecto de relajación", manteniéndose sin variación el sistema enzimático antioxidante. 2) La sequía aumentará la generación de ROS en las dos especies, a la vez que inducirá una mayor actividad del sistema antioxidante para contrarrestar los efectos perjudiciales de las ROS; no obstante, se observará daño oxidativo en aquellos tratamientos más afectados por la sequía. 3) Cuando ambos factores ambientales actúen en combinación, el elevado CO₂ permitirá a las plantas una mayor activación del sistema antioxidante, lo que se traduciría en un menor daño oxidativo. 4) La competencia beneficiará a Tp a costa de Ac debido a la menor captación de agua de esta última cuando ambas especies se encuentran en mezcla, exponiendo a Ac a un mayor riesgo oxidativo.

6.2. Resultados

Conviene recordar que la incidencia de la sequía fue desigual entre los tratamientos. Así, utilizando el RWC como indicador, en el día 9 (sequía progresiva) el tratamiento más afectado por la sequía fue el monocultivo de Tp en ambas concentraciones de CO₂. Por el contrario, ambas especies en mezcla y el monocultivo de Ac no vieron alterado su RWC en dichas condiciones. En el día 16 (sequía homogénea) todos los tratamientos presentaron el mismo estado hídrico del suelo, viéndose el RWC afectado en todas las especies.

6.2.1. Actividades enzimáticas en sequía progresiva

6.2.1.1. Superóxido dismutasa

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) fue similar entre especies cuando crecían en monocultivo, mientras que en mezcla, Ac mostró valores un 32% superiores que Tp, independientemente de la concentración de CO₂ (Fig. 6.2A; Tabla 6.1). Este incremento concuerda con el ascenso de la actividad SOD de Ac registrado en mezcla en comparación con el monocultivo en ambas concentraciones de CO₂. En cambio, en Tp no se observaron diferencias causadas por la competencia. Ni la concentración de CO₂ ni la sequía produjeron diferencias significativas en Ac, pero sí en Tp; así, la sequía provocó un incremento del 16% en la actividad SOD cuando Tp creció en monocultivo a CO₂ ambiental, pero a CO₂ elevado no se observó aumento. Por el contrario, en mezcla, la tendencia fue la opuesta, observándose un incremento de la actividad en sequía a CO₂ elevado (22%), pero no a CO₂ ambiental.

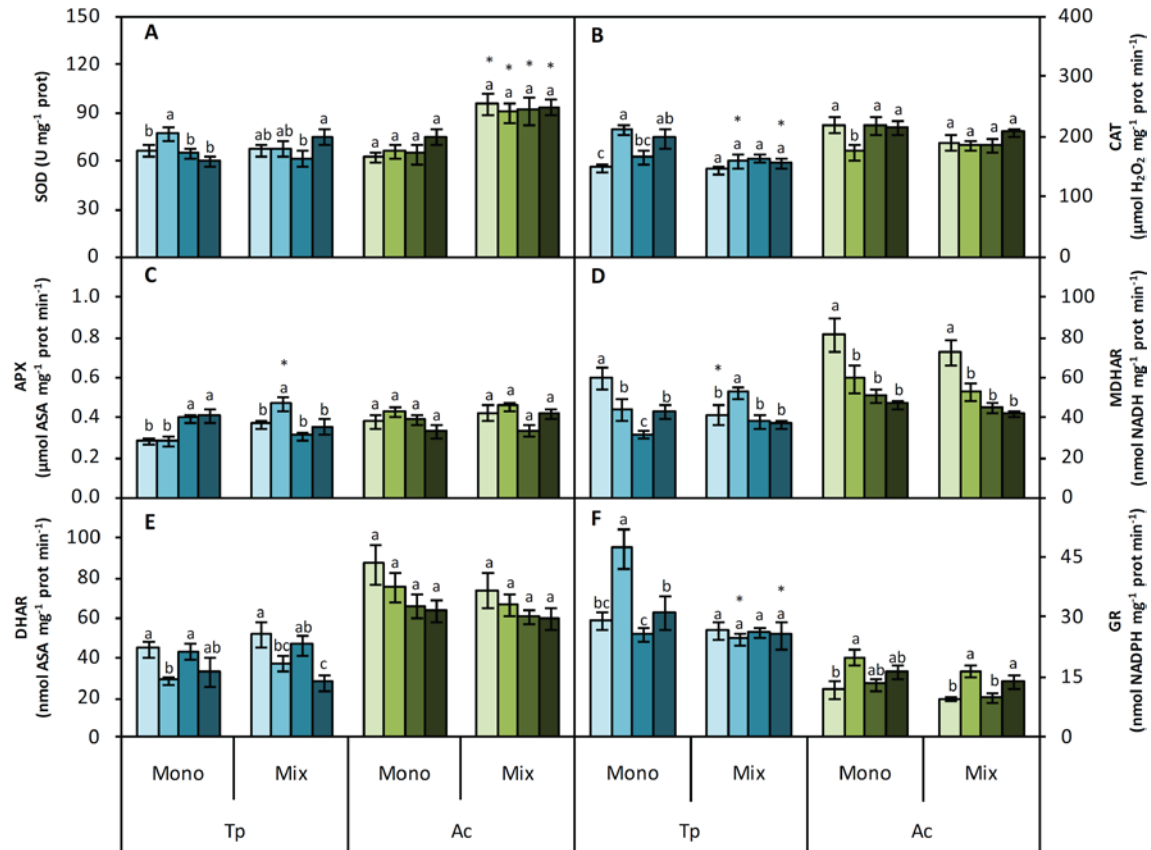


Fig. 6.2. Effects of drought, CO₂, and competition in the 9th day on superoxide dismutase activity (SOD; A), catalase activity (CAT; B), ascorbate peroxidase activity (APX; C), monodehydroascorbate reductase activity (MDHAR; D), dehydroascorbate reductase activity (DHAR; E), and glutathione reductase activity (GR; F). Lightest bars represent well-watered plants at ambient CO₂, light bars represent drought plants at ambient CO₂, dark bars represent well-watered plants at elevated CO₂, and darkest bars represent drought plants at elevated CO₂. Tp denotes *Trifolium pratense*; Ac, *Agrostis capillaris*; Mono, monoculture; Mix, mixture. Different letters indicate significant differences at $P \leq 0.05$ within the same species and type of competition. * indicates differences within the same species between monoculture and mixture.

6.2.1.2. Catalasa

La figura 6.2B muestra los valores de la actividad catalasa (CAT). La actividad CAT fue aproximadamente un 30% inferior en Tp que en Ac a CO₂ ambiental (Tabla 6.1). La sequía sólo produjo diferencias significativas en monocultivo. Concretamente, la actividad CAT aumentó un 42% en Tp y disminuyó un 20% en Ac, bajo condiciones

de CO₂ ambiental. Por el contrario, a elevado CO₂ no se registraron cambios en ninguna de las especies.

6.2.1.3. Ascorbato peroxidasa

La actividad ascorbato peroxidasa (APX) fue un 35% inferior en Tp que en Ac cuando crecían en monocultivo a CO₂ ambiental, mientras que no se observaron diferencias a elevado CO₂, ni en mezcla (Fig. 6.2C; Tabla 6.1). El aumento de la concentración de CO₂ incrementó la actividad APX un 42% en Tp en monocultivo. La sequía provocó una mayor actividad APX cuando las plantas crecieron en mezcla, un 28% en Tp a CO₂ ambiental, no registrándose diferencias en el resto de los tratamientos.

6.2.1.4. Monodehidroascorbato reductasa

La actividad monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) presentó unos valores superiores en Ac, concretamente un 36% y un 75% mayores, en monocultivo y en mezcla, respectivamente, que en Tp en condiciones de buen aporte hídrico a CO₂ ambiental; mientras que, bajo elevado CO₂, sólo se registraron diferencias en monocultivo (Fig. 6.2D; Tabla 6.1). La competencia afectó a la actividad MDHAR en Tp, reduciendo un 43% la actividad cuando creció en mezcla con respecto al monocultivo a CO₂ ambiental. El incremento de la concentración de CO₂ redujo la actividad MDHAR, un 47% en Tp en monocultivo y un 38% en Ac, tanto en monocultivo como en mezcla. La sequía redujo la actividad a CO₂ ambiental un 27% en Tp en monocultivo y en Ac en ambos tipos de competencia, mientras que cuando Tp creció en mezcla la sequía aumentó la actividad un 26%. Bajo condiciones combinadas de elevado CO₂ y sequía sólo se detectaron diferencias en Tp en monocultivo, donde la actividad aumentó un 37%.

6.2.1.5. Dehidroascorbato reductasa

Bajo CO₂ ambiental, en monocultivo, la actividad dehidroascorbato reductasa (DHAR) fue un 96% superior en Ac que en Tp, y un 43% en mezcla; mientras que a CO₂ elevado las diferencias fueron menores, del 52% y del 30%, respectivamente (Fig. 6.2E; Tabla 6.1). La sequía redujo la actividad DHAR de Tp un 35% en monocultivo y un 27% en mezcla a CO₂ ambiental. A elevado CO₂ la disminución de la actividad causada por la sequía en Tp fue del 23% en monocultivo y del 40% en mezcla. En Ac las diferencias no fueron significativas en ningún tratamiento.

6.2.1.6. Glutación reductasa

La actividad glutatión reductasa (GR) fue aproximadamente 2,5 veces superior en Tp que en Ac, cualquiera que fuera la concentración de CO₂ y el tipo de competencia (Fig. 6.2F; Tabla 6.1). El elevado CO₂ no produjo diferencias en ninguna especie en condiciones de buen aporte hídrico. La sequía incrementó la actividad GR de Tp en monocultivo un 61% a CO₂ ambiental y un 22% a CO₂ elevado. En Ac, la sequía indujo cambios en la actividad GR en monocultivo a CO₂ ambiental, aumentando un 70%; en cambio, en mezcla, la sequía aumentó la actividad GR tanto a CO₂ ambiental como a elevado, siendo el incremento del 70% a CO₂ ambiental y del 40% a CO₂ elevado.

6.2.2. Actividades enzimáticas en sequía homogénea

6.2.2.1. Superóxido dismutasa

De la misma manera que ocurrió en el día 9, la actividad SOD en el día 16 aumentó en Ac cuando creció en mezcla con respecto a cuando lo hizo en monocultivo, un 16% a CO₂ ambiental y un 30% a CO₂ elevado (Fig. 6.3A; Tabla 6.2). El incremento

de la concentración de CO₂ redujo la actividad SOD un 18% en Ac en monocultivo. La sequía no causó diferencias en la actividad SOD en el día 16 en ninguno de los tratamientos.

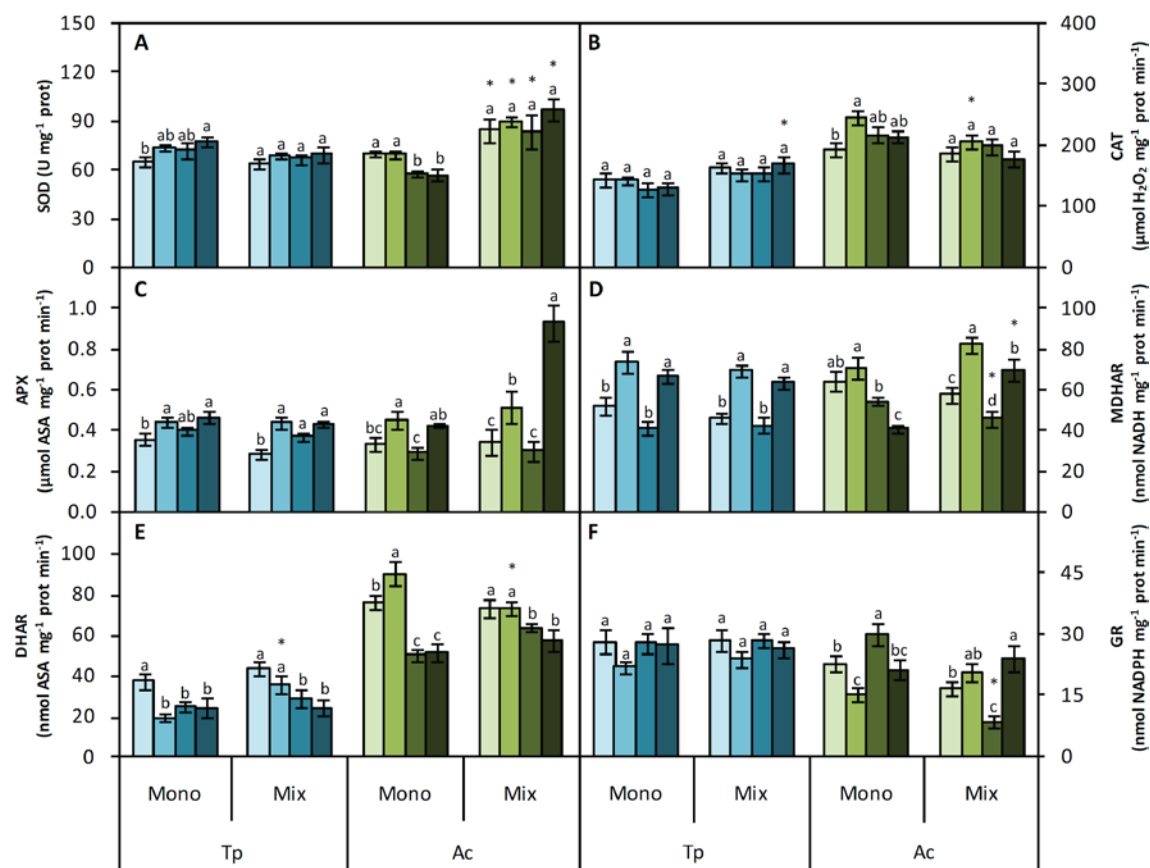


Fig. 6.3. Effects of drought, CO₂, and competition in the 16th day on superoxide dismutase activity (SOD; A), catalase activity (CAT; B), ascorbate peroxidase activity (APX; C), monodehydroascorbate reductase activity (MDHAR; D), dehydroascorbate reductase activity (DHAR; E), and glutathione reductase activity (GR; F). Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 6.2.

6.2.2.2. Catalasa

Tal y como ocurrió en el periodo de sequía progresiva, la actividad CAT fue superior en Ac que en Tp, entre 30-50% (Fig. 6.3B; Tabla 6.2). La actividad CAT no sufrió ninguna variación con los tratamientos, excepto en Ac en monocultivo, donde la sequía incrementó la actividad un 27% a CO₂ ambiental.

6.2.2.3. Ascorbato peroxidasa

La figura 6.3C muestra la actividad APX en el día 16. El aumento de la concentración de CO₂ incrementó la actividad APX en Tp, un 12% en monocultivo y un 29% en mezcla (Tabla 6.2). La sequía provocó una mayor actividad de Tp, siendo sólo significativo a CO₂ ambiental, un 25% en monocultivo y un 52% en mezcla. En el caso de Ac y bajo CO₂ ambiental, la sequía aumentó la actividad un 35% y un 49%, en monocultivo y mezcla, respectivamente; mientras que a CO₂ elevado los incrementos fueron superiores, del 46% en monocultivo y del 207% en mezcla.

6.2.2.4. Monodehidroascorbato reductasa

En condiciones de buen aporte hídrico, la actividad MDHAR fue un 25% superior en Ac que en Tp bajo CO₂ ambiental, independientemente del tipo de competencia (Fig. 6.3D; Tabla 6.2). El incremento de la concentración de CO₂ sólo afectó a Ac en mezcla, reduciendo la actividad un 20%. La sequía aumentó la actividad MDHAR en Tp, un 40% y un 62% en monocultivo, a CO₂ ambiental y elevado, respectivamente, mientras que en mezcla el aumento fue un 50%, independientemente de la concentración de CO₂. En Ac, la sequía provocó mayor actividad MDHAR en mezcla, siendo el incremento de un 42% a CO₂ ambiental y de un 50% a CO₂ elevado.

6.2.2.5. Dehidroascorbato reductasa

La actividad DHAR de Ac en condiciones de buen aporte hídrico fue el doble que la mostrada por Tp en monocultivo cualquiera que fuera la concentración de CO₂ y, en mezcla, un 67% superior a CO₂ ambiental y un 110% a CO₂ elevado (Fig. 6.3E; Tabla 6.2). El elevado CO₂ disminuyó la actividad de Tp un 33% en ambos tipos de competencia, mientras que en Ac las reducciones fueron dependientes del tipo de

competencia, un 33% en monocultivo y un 12% en mezcla. La sequía sólo afectó en los monocultivos de ambas especies, con efectos opuestos bajo CO₂ ambiental, disminuyendo la actividad de Tp un 48% y aumentando la de Ac un 19%; mientras que a elevado CO₂ no produjo diferencias significativas.

6.2.2.6. Glutación reductasa

En la actividad GR sólo se detectaron diferencias entre especies en condiciones de buen aporte hídrico en mezcla, donde Tp presentó valores un 68% superiores a CO₂ ambiental y un 230% a CO₂ elevado (Fig. 6.3F; Tabla 6.2). El incremento de la concentración de CO₂ y la sequía no afectaron a Tp, independientemente del tipo de competencia, mientras que en Ac tuvieron efectos opuestos en función del tipo de competencia. Concretamente, el elevado CO₂ en condiciones de buen aporte hídrico aumentó un 30% la actividad GR en monocultivo y la disminuyó un 49% en mezcla. La sequía redujo la actividad un 30% en monocultivo cualquiera que fuera la concentración de CO₂, y la incrementó en mezcla, un 21% a CO₂ ambiental y un 180% a CO₂ elevado.

6.2.3. Niveles de metabolitos antioxidantes en sequía progresiva

En la figura 6.4A se representan los cambios ocurridos tras 9 días de sequía en la concentración de ascorbato reducido bajo las distintas condiciones de crecimiento. En condiciones de buen aporte hídrico, la concentración de ascorbato reducido fue inferior en Ac que en Tp, un 27% en monocultivo y un 63% en mezcla, independientemente de la concentración de CO₂ (Tabla 6.1). Bajo ambas concentraciones de CO₂ y en condiciones de buen aporte hídrico no se observaron diferencias en Tp entre los tratamientos de competencia, mientras que cuando Ac creció en mezcla mostró un 50%

menos de ascorbato reducido que en monocultivo, independientemente de la concentración de CO₂. El aumento de la concentración de CO₂ no provocó ninguna variación en la concentración de ascorbato reducido en las dos especies de estudio, independientemente del tipo de competencia. Nueve días de sequía provocaron en Tp un aumento en la concentración de Asa del 37% en monocultivo; por el contrario, en mezcla no se observaron diferencias a CO₂ ambiental. A CO₂ elevado en ambos tipos de competencia se produjo un incremento en la concentración de ascorbato reducido, siendo éste de un 50% en monocultivo y de un 40% en mezcla. En Ac en ambos tipos de competencia, la sequía provocó un ligero incremento, aunque no significativo, bajo ambas concentraciones de CO₂.

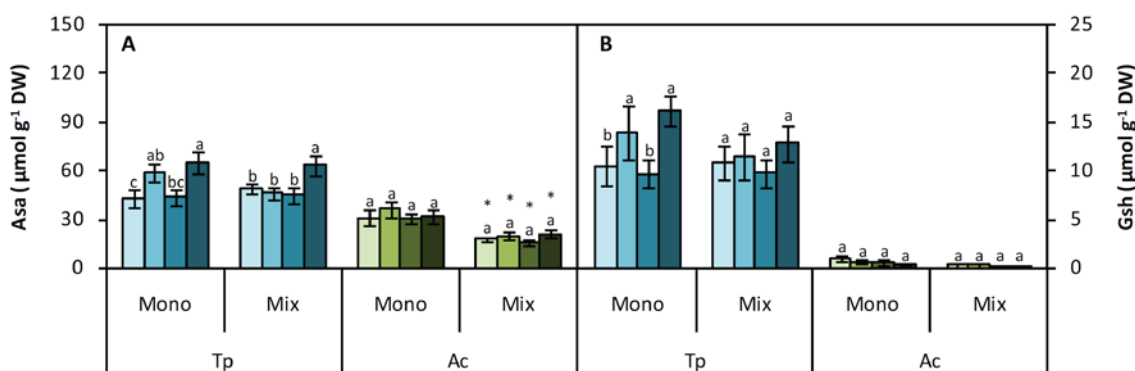


Fig. 6.4. Effects of drought, CO₂, and competition in the 9th day on the concentration of reduced ascorbate (Asa; A) and the concentration of reduced glutathione (Gsh; B). Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 6.2.

La concentración de glutatión reducido (Gsh) fue muy superior en Tp que en Ac (Fig. 6.4B; Tabla 6.1). La sequía indujo un incremento en la concentración de Gsh en Tp cuando creció en monocultivo, de un 32% a CO₂ ambiental y de un 60% a CO₂ elevado; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en mezcla. En Ac no se detectaron diferencias significativas en ningún tratamiento.

Tanto el ascorbato como el glutatión se encontraron próximos al límite de detección en su forma oxidada lo que impidió su correcta cuantificación.

El análisis gráfico de vectores (GVA) fue utilizado para visualizar el patrón de distribución de los esqueletos carbonados entre el crecimiento y la síntesis de ascorbato (contenido). En Tp, el elevado CO₂ en condiciones de buen aporte hídrico no modificó la concentración de ascorbato cualquiera que fuera el tipo de competencia, al aumentar tanto la síntesis de ascorbato como la acumulación de biomasa alrededor de un 20% (Fig. 6.5A). En condiciones de sequía en monocultivo, el incremento de la concentración de ascorbato reducido a CO₂ ambiental fue causado por una reducción en el crecimiento del 27%, mientras que la síntesis no se vio modificada. En mezcla, la sequía a CO₂ ambiental no modificó la concentración de ascorbato, pero disminuyó la síntesis y el crecimiento aproximadamente un 33%. A elevado CO₂ y sequía, la síntesis aumentó en ambos tipos de competencia, un 54% en monocultivo y un 60% en mezcla con respecto a plantas crecidas a CO₂ ambiental y buen aporte hídrico. En monocultivo, esto provocó una mayor concentración de ascorbato al no verse alterado el crecimiento, mientras que, en mezcla, a la mayor síntesis le acompañó un aumento del crecimiento del 22%, lo que se tradujo, finalmente, en un incremento en la concentración de ascorbato reducido del 31%.

En el caso de Ac, el elevado CO₂ incrementó un 27% la síntesis de ascorbato, independientemente del tipo de competencia en condiciones de buen aporte hídrico, acompañado de un aumento del crecimiento del 28% en monocultivo y del 47% en mezcla, lo que implicó que no hubiera cambios en la concentración (Fig. 6.5B). La sequía a CO₂ ambiental provocó un aumento en la concentración de ascorbato del 16% en monocultivo y del 12% en mezcla. Esto estuvo provocado por un descenso del 21% en el crecimiento y del 8% en la síntesis en monocultivo, mientras que en mezcla se observó un incremento del 18% en la síntesis y el crecimiento no varió. La sequía a elevado CO₂ no provocó cambios en monocultivo, en cambio, en mezcla, aumentó la concentración un 17% por un incremento de la síntesis del 57% y del crecimiento del 34%.

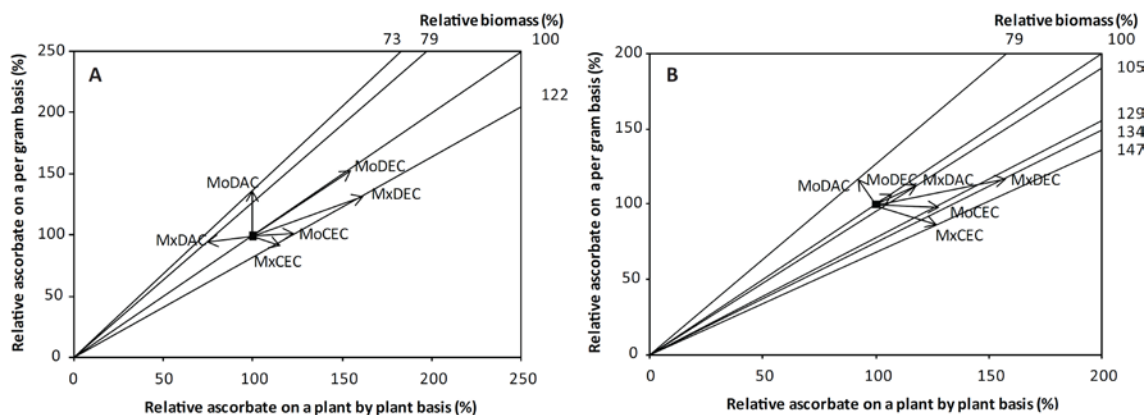


Fig. 6.5. Graphical vector analysis showing the different accumulation of reduced ascorbate expressed as relative content (x-axes), relative concentration (y-axes), and relative biomass (z-axes) changes in *Trifolium pratense* (A) and *Agrostis capillaris* (B) in the 9th day. Mo: monoculture; Mx: Mixture; C: Well-watered; D: Drought; AC: 400 $\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol}^{-1}$; EC: 700 $\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol}^{-1}$. For plants grown at monoculture, the plants grown at 400 $\mu\text{mol CO}_2$ in monoculture and well-watered (\blacksquare , MoCAC) were used as a reference point and for plants plants grown at mixture, the plants grown at 400 $\mu\text{mol CO}_2$ in mixture and well-watered (\blacksquare , MxCAC) were used as a reference point.

6.2.4. Niveles de metabolitos antioxidantes en sequía homogénea

Tal y como ocurrió en el día 9, en el día 16, Ac presentó una concentración un 56% inferior de ascorbato reducido que Tp cuando ambas especies crecieron en mezcla en condiciones de buen aporte hídrico a CO_2 ambiental; sin embargo, en monocultivo en el día 16 no hubo diferencias entre especies (Fig. 6.6A; Tabla 6.2). La competencia no produjo diferencias en Tp, pero sí en Ac, donde las plantas crecidas en monocultivo presentaron una concentración un 110% superior que en mezcla a CO_2 ambiental y un 160% a CO_2 elevado. Tras 16 días de sequía, el efecto de ésta sobre Tp se exacerbó respecto a lo ocurrido tras 9 días de sequía, aumentando la concentración de ascorbato un 100% en monocultivo y un 120% en mezcla a CO_2 ambiental, mientras que a CO_2 elevado los incrementos fueron menores, del 33% en monocultivo y del 45% en mezcla. En el caso de Ac, en monocultivo no se produjeron diferencias, mientras que en mezcla la sequía incrementó un 90% la concentración de ascorbato reducido, independientemente de la concentración de CO_2 .

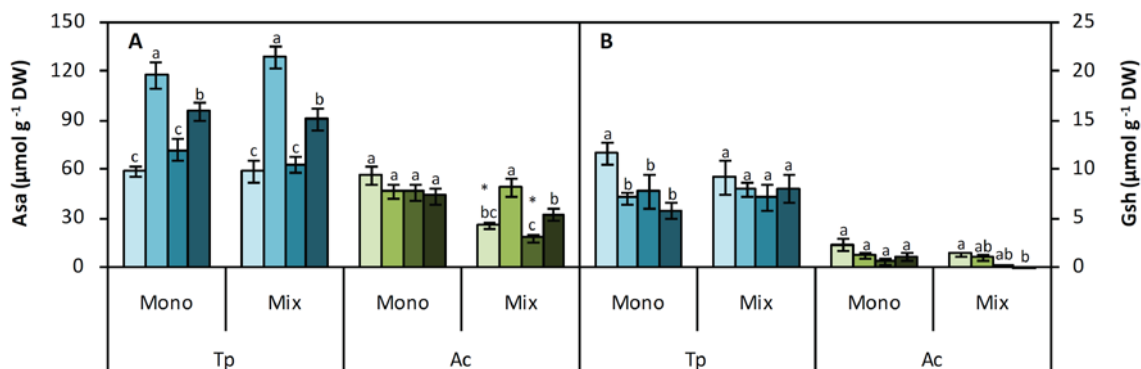


Fig. 6.6. Effects of drought, CO₂, and competition in the 16th day on the concentration of reduced ascorbate (Asa; A) and the concentration of reduced glutathione (Gsh; B). Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 6.2.

De la misma manera que se observó en el día 9, la concentración de Gsh de Tp fue mayor que la de Ac (Fig. 6.6B; Tabla 6.2). En Tp, el elevado CO₂ disminuyó la concentración de Gsh un 33% en condiciones de buen aporte hídrico en monocultivo, pero no en mezcla. La sequía en monocultivo redujo la concentración de Gsh un 39% a CO₂ ambiental. En Ac no se detectaron diferencias significativas.

Igual que ocurrió en el día 9, en el día 16 tanto el ascorbato como el glutatión presentaron concentraciones inferiores o alrededor del rango de detección en la forma oxidada.

El análisis GVA mostró que, en el día 16, el aumento de la concentración de CO₂ en condiciones de buen aporte hídrico aumentó la concentración de ascorbato un 23% en el monocultivo de Tp, por un incremento en la síntesis del 57% y en la acumulación de biomasa del 27% (Fig. 6.7A). En mezcla, en cambio, el aumento en la biomasa foliar y en la síntesis de ascorbato fue similar (45%), por lo que la concentración no varió. La sequía en monocultivo aumentó la concentración de ascorbato un 103% a CO₂ ambiental y un 65% a CO₂ elevado, mientras que disminuyó el crecimiento un 60% a CO₂ ambiental y un 53% a CO₂ elevado a la vez que redujo la síntesis de ascorbato alrededor de un 20%, independientemente de la concentración de CO₂. En mezcla, la sequía también aumentó la concentración de ascorbato un 120% a CO₂ ambiental y un 55% a CO₂ elevado, mientras que el crecimiento se redujo un 48% y un 15% a CO₂

ambiental y elevado, respectivamente, pero la síntesis se incrementó en sequía, un 15% a CO₂ ambiental y un 31% a CO₂ elevado.

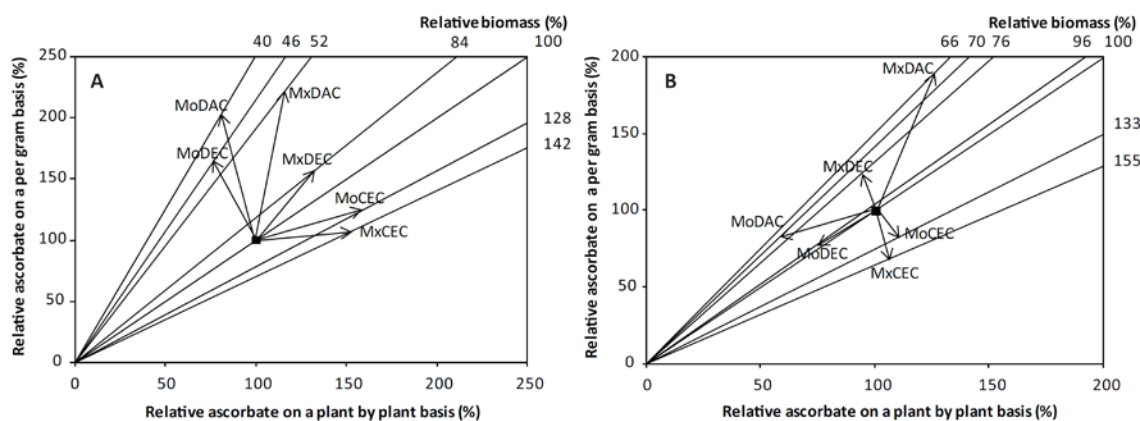


Fig. 6.7. Graphical vector analysis showing the different accumulation of reduced ascorbate expressed as relative content (x-axes) and relative concentration (y-axes), and relative biomass (z-axes) changes in *Trifolium pratense* (A) and *Agrostis capillaris* (B) in the 16th day. Mo: monoculture; Mx: Mixture; C: Well-watered; D: Drought; AC: 400 $\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol}^{-1}$; EC: 700 $\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol}^{-1}$. For plants grown at monoculture, the plants grown at 400 $\mu\text{mol CO}_2$ in monoculture and well-watered (\blacksquare , MoCAC) were used as a reference point and for plants plants grown at mixture, the plants grown at 400 $\mu\text{mol CO}_2$ in mixture and well-watered (\blacksquare , MxCAC) were used as a reference point.

El elevado CO₂ en condiciones de buen aporte hídrico redujo la concentración de ascorbato en Ac, un 18% en monocultivo y un 32% en mezcla, debido a un mayor incremento en la acumulación de biomasa (33% y 54%) que en la síntesis de ascorbato (10% y 6%; Fig. 6.7B). La sequía redujo la concentración de ascorbato en monocultivo un 17% bajo CO₂ ambiental y un 22% bajo elevado CO₂, mientras que la síntesis de ascorbato cayó un 42% y un 26%, respectivamente. El crecimiento sólo se vio afectado a CO₂ ambiental, donde disminuyó un 30%. Cuando las plantas crecieron en mezcla, la sequía aumentó la concentración de ascorbato, un 89% y un 23% para CO₂ ambiental y elevado, respectivamente. En mezcla, el efecto de la sequía sobre la síntesis de ascorbato fue dependiente de la concentración de CO₂, así, bajo CO₂ ambiental aumentó un 17% y bajo elevado CO₂ disminuyó un 8%; mientras que el crecimiento se redujo en ambas concentraciones de CO₂, un 33% a CO₂ ambiental y un 24% a CO₂ elevado.

6.2.5. Peroxidación de lípidos en sequía progresiva

En el día 9, ninguno de los tratamientos del estudio provocó cambios estadísticamente significativos en la peroxidación de lípidos, sin embargo, sí se observó una tendencia de incremento en condiciones de sequía (Fig. 6.8; Tabla 6.1).

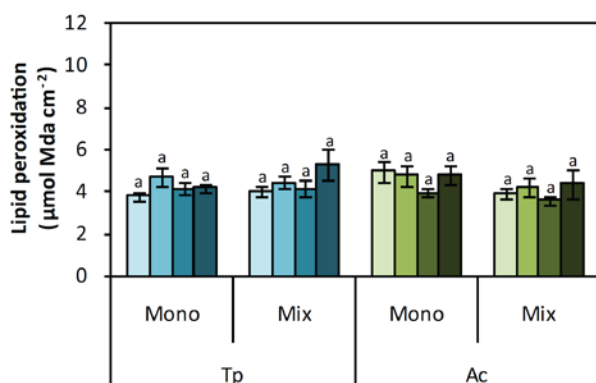


Fig. 6.8. Effects of drought, CO₂, and competition on lipid peroxidation in the 9th day. Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 6.2.

6.2.6. Peroxidación de lípidos en sequía homogénea

Cuando la sequía que se aplicó fue similar entre tratamientos, sí se detectaron cambios estadísticamente significativos en Ac cuando creció en mezcla y en sequía bajo CO₂ elevado, donde se incrementó la peroxidación de lípidos un 61% (Fig. 6.9; Tabla 6.2). Tal y como ocurrió en el día 9, el resto de los tratamientos del estudio no mostraron cambios estadísticamente significativos en la peroxidación de lípidos, aunque siguió existiendo una tendencia de aumento en condiciones de sequía.

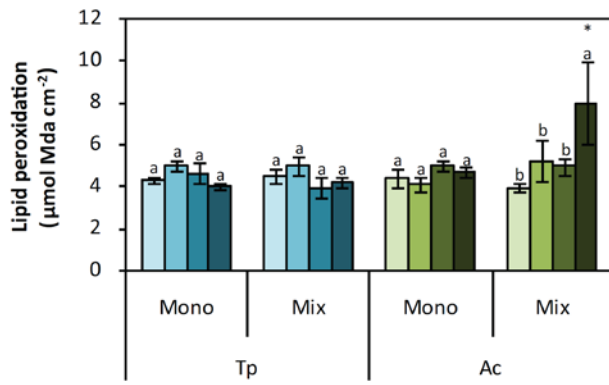


Fig. 6.9. Effects of drought, CO₂, and competition on lipid peroxidation in the 16th day. Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 6.2.

Table 6.1. Summary of ANOVA results (*P*-values) for the effects of CO₂ (ambient and elevated), competition (comp; monoculture and mixture), water (well-watered and drought), and species (Ac and Tp) and their interactions in the 9th day. Bold values indicate significance at *P*≤0.05.

| | <i>SOD</i> | <i>CAT</i> | <i>APX</i> | <i>MDHAR</i> | <i>DHAR</i> | <i>GR</i> | <i>Asa</i> | <i>Gsh</i> | <i>MDA</i> |
|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| CO ₂ | 0.755 | 0.093 | 0.225 | 0.000 | 0.010 | 0.011 | 0.386 | 0.680 | 0.847 |
| Comp | 0.000 | 0.001 | 0.376 | 0.038 | 0.497 | 0.000 | 0.001 | 0.487 | 0.443 |
| Water | 0.157 | 0.121 | 0.016 | 0.012 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.054 | 0.011 |
| Sp | 0.000 | 0.000 | 0.011 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.955 |
| CO ₂ xComp | 0.678 | 0.824 | 0.000 | 0.381 | 0.842 | 0.032 | 0.553 | 0.731 | 0.240 |
| CO ₂ xWater | 0.587 | 0.751 | 0.353 | 0.003 | 0.481 | 0.040 | 0.132 | 0.551 | 0.407 |
| CO ₂ xSp | 0.248 | 0.396 | 0.018 | 0.045 | 0.089 | 0.111 | 0.110 | 0.895 | 0.226 |
| CompWater | 0.682 | 0.607 | 0.028 | 0.338 | 0.946 | 0.005 | 0.239 | 0.775 | 0.506 |
| CompSp | 0.000 | 0.393 | 0.742 | 0.331 | 0.069 | 0.043 | 0.007 | 0.723 | 0.036 |
| WaterxSp | 0.640 | 0.005 | 0.685 | 0.002 | 0.139 | 0.908 | 0.026 | 0.047 | 0.619 |
| CO ₂ xCompWater | 0.196 | 0.910 | 0.385 | 0.019 | 0.579 | 0.081 | 0.206 | 0.537 | 0.513 |
| CO ₂ xCompSp | 0.145 | 0.463 | 0.001 | 0.744 | 0.214 | 0.030 | 0.835 | 0.746 | 0.826 |
| CO ₂ xWaterxSp | 0.432 | 0.008 | 0.914 | 0.211 | 0.552 | 0.729 | 0.118 | 0.569 | 0.322 |
| CompWaterxSp | 0.243 | 0.001 | 0.942 | 0.539 | 0.593 | 0.005 | 0.189 | 0.714 | 0.857 |
| CO ₂ xCompWaterxSp | 0.217 | 0.627 | 0.049 | 0.022 | 0.778 | 0.210 | 0.644 | 0.599 | 0.185 |

Table 6.2. Summary of ANOVA results (*P*-values) for the effects of CO₂ (ambient and elevated), competition (comp; monoculture and mixture), water (well-watered and drought), and species (Ac and Tp) and their interactions in the 16th day. Bold values indicate significance at *P*≤0.05.

| | <i>SOD</i> | <i>CAT</i> | <i>APX</i> | <i>MDHAR</i> | <i>DHAR</i> | <i>GR</i> | <i>Asa</i> | <i>Gsh</i> | <i>MDA</i> |
|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| CO ₂ | 0.754 | 0.322 | 0.025 | 0.000 | 0.000 | 0.131 | 0.001 | 0.031 | 0.151 |
| Comp | 0.000 | 0.944 | 0.024 | 0.421 | 0.125 | 0.090 | 0.003 | 0.479 | 0.090 |
| Water | 0.026 | 0.250 | 0.000 | 0.000 | 0.210 | 0.325 | 0.000 | 0.138 | 0.029 |
| Sp | 0.006 | 0.000 | 0.380 | 0.056 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.031 |
| CO ₂ xComp | 0.174 | 0.605 | 0.022 | 0.153 | 0.191 | 0.053 | 0.106 | 0.579 | 0.389 |
| CO ₂ xWater | 0.855 | 0.163 | 0.064 | 0.236 | 0.896 | 0.061 | 0.001 | 0.168 | 0.958 |
| CO ₂ xSp | 0.072 | 0.984 | 0.425 | 0.027 | 0.001 | 0.934 | 0.833 | 0.413 | 0.001 |
| CompWater | 0.440 | 0.332 | 0.002 | 0.001 | 0.349 | 0.001 | 0.007 | 0.215 | 0.008 |
| CompSp | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.021 | 0.099 | 0.037 | 0.007 | 0.459 | 0.048 |
| WaterxSp | 0.873 | 0.330 | 0.001 | 0.002 | 0.014 | 0.103 | 0.000 | 0.178 | 0.202 |
| CO ₂ xCompWater | 0.585 | 0.403 | 0.057 | 0.436 | 0.612 | 0.338 | 0.341 | 0.666 | 0.182 |
| CO ₂ xCompSp | 0.029 | 0.366 | 0.031 | 0.648 | 0.000 | 0.141 | 0.569 | 0.391 | 0.114 |
| CO ₂ xWaterxSp | 0.464 | 0.009 | 0.003 | 0.159 | 0.018 | 0.836 | 0.002 | 0.486 | 0.113 |
| CompWaterxSp | 0.135 | 0.226 | 0.015 | 0.000 | 0.094 | 0.001 | 0.142 | 0.158 | 0.045 |
| CO ₂ xCompWaterxSp | 0.657 | 0.878 | 0.012 | 0.109 | 0.189 | 0.112 | 0.694 | 0.802 | 0.711 |

6.3. Discusión

6.3.1. Efecto de la competencia en condiciones ambientales

Cuando Ac creció en mezcla la enzima SOD vio incrementada su actividad (Figs. 6.2A y 6.3A). Como se ha constatado en el capítulo 5, los menores valores de Φ PSII registrados cuando Ac estaba en competencia con Tp (Figs. 5.7D y 5.8D) manifestaron una menor proporción de energía destinada a procesos fotoquímicos, lo que podría indicar una acumulación de la energía en las clorofilas, ya que, además, no se observó un incremento en el *NPQ* (Figs. 5.7F y 5.8F). En estas condiciones, la energía en la clorofila fotoactivada excita al oxígeno en estado triplete y lo convierte en $^1\text{O}_2$ (Sgherri & Pérez-López, 2013). El $^1\text{O}_2$ es altamente reactivo y la planta tiene que detoxificarlo rápidamente. Existen dos mecanismos para metabolizar el $^1\text{O}_2$, por un lado, la detoxificación física y, por otro lado, la química, llevadas a cabo principalmente por antioxidantes liposolubles e hidrosolubles, respectivamente (Triantaphylidès & Havaux, 2009). En algunos de estos procesos de detoxificación del $^1\text{O}_2$ se ha observado una formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Saito et al., 1981; Inoue et al., 1985). La mayor actividad SOD en estas condiciones podría demostrar que, en efecto, existe una relación entre la generación del $^1\text{O}_2$ y el $\text{O}_2^{\cdot-}$. Este aumento de la actividad SOD permite a la planta metabolizar el $\text{O}_2^{\cdot-}$ generado y evitar el daño en las membranas (Figs. 6.8 y 6.9). A pesar de observarse un incremento en la actividad SOD, esto no sucedió con la actividad de las enzimas implicadas en el ciclo de Halliwell y Asada, lo que podría indicarnos, junto con el hecho de la ausencia de daño en las membranas, que estas enzimas tienen unos valores constitutivos que permiten detoxificar los mayores niveles de H_2O_2 producidos por el incremento de la actividad SOD.

6.3.2. Efecto del CO₂ en condiciones de buen aporte hídrico

En condiciones de buen aporte hídrico, el elevado CO₂ produjo una respuesta del sistema antioxidante que era dependiente de la especie, del tipo de competencia y de la enzima o metabolito analizado.

En general, no se registraron cambios en las actividades de las enzimas (Figs. 6.2 y 6.3), confirmando de esta manera la hipótesis inicial, de una menor generación de ROS a elevado CO₂ y, por tanto, a elevado CO₂ no existe una mayor necesidad de sistemas de detoxificación de las ROS (Marabottini et al., 2001). Esta menor generación de ROS se debe, por un lado, a la reducción de la actividad de la reacción de Mehler (Polle, 1996) por una mayor tasa de consumo de NADPH debido al incremento de las enzimas implicadas en el ciclo de Calvin, como observaron Geiger et al. (1999) en plantas con un buen aporte de nitrógeno, como es el caso de este estudio. Y, por otro lado, al aumento de la concentración externa de CO₂ incrementa el cociente CO₂/O₂ en los cloroplastos, lo que se traduce en una menor fotorrespiración (Pérez-López et al., 2012). De este modo, se produce el denominado efecto de relajación del sistema antioxidante, por el cual, debido a la demanda energética a elevado CO₂, las actividades enzimáticas antioxidantes disminuyen o se mantienen constantes (Badiani et al., 1993).

Otros autores han obtenido resultados similares. Así, Sanità di Toppi et al. (2002) no registraron cambios en las actividades SOD, CAT, APX y MDHAR de *Trifolium repens* cuando crecieron las plantas a elevado CO₂. Pérez-López et al. (2009b) no observaron cambios en las actividades enzimáticas SOD, CAT, APX, MDHAR, DHAR y GR en plantas de cebada expuestas a elevado CO₂. Por el contrario, Schwanz et al. (1996c) observaron descensos en las actividades SOD y APX en roble, pero las actividades GR y CAT se mantuvieron constantes. Erice et al. (2007) constataron descensos en las actividades de la GR y SOD y no observaron diferencias en las actividades APX y CAT en alfalfa. Badiani et al. (1998) en estudios con *Agrostis stolonifera* observaron efectos variables sobre las actividades enzimáticas ante el aumento de la concentración externa de CO₂ hasta 850 μmol mol⁻¹; así, la actividad DHAR disminuyó y las actividades APX y CAT se mantuvieron constantes. Estos datos

muestran que el conocimiento relativo al efecto del CO₂ sobre el metabolismo antioxidante no es concluyente.

A pesar del mencionado efecto de relajación del sistema antioxidante bajo condiciones de elevado CO₂, las concentraciones de ascorbato y glutatión en su forma reducida no disminuyeron (Figs. 6.4 y 6.6). Es más, el contenido total de ascorbato en hoja en las dos especies aumentó cuando crecieron bajo elevado CO₂ (Figs. 6.5 y 6.7) lo que nos indica que su síntesis está aumentando al mismo ritmo que el incremento de la biomasa (Koricheva, 1999). Wheeler et al. (1998) calcularon que el 1% de la glucosa de la planta es utilizada para la síntesis del ascorbato, por lo que un incremento en la síntesis del ascorbato podría ser resultado del incremento de la concentración de glucosa en dichas condiciones (Figs. 5.9A y 5.10A). Schwanz et al. (1996b) y Pérez-López et al. (2013b) también apuntaron una mayor síntesis de ascorbato bajo condiciones de elevado CO₂ en hojas de sol de naranjo y en plantas de lechuga, respectivamente.

Este hecho pone de manifiesto que ambos metabolitos cumplen otras funciones en las plantas además de su papel antioxidante y, por tanto, las plantas mantienen su concentración relativamente constante. El Gsh posee varias funciones, entre otras, participa en la asimilación del azufre, en la señalización celular y en el desarrollo embrionario y de los meristemos (Leustek & Saito, 1999; Vernoux et al., 2000; Gomez et al., 2004; Reichheld et al., 2007; Frottin et al., 2009). El ascorbato actúa como cofactor de la enzima violoxantina deepoxidasa, que participa en la disipación de energía lumínica en forma de calor en el ciclo de las xantofilas, y de varias enzimas implicadas en la síntesis de compuestos como el ácido abscísico, el etileno, el ácido giberélico y los flavonoides (Smirnoff, 2000; Foyer & Noctor, 2011; Page et al., 2012).

6.3.3. Efecto de la sequía bajo CO₂ ambiental

A pesar del efecto de la sequía sobre los procesos fotoquímicos (como se ha mencionado en el capítulo 5) y el estrés oxidativo esperado asociado a este hecho, la

integridad de las membranas no se vio afectada como demuestra la constancia de la concentración en malondialdehído (Figs. 6.8 y 6.9). Este hecho puede ser debido a la respuesta antioxidante de la planta, como se observó en los incrementos de las actividades enzimáticas y en el aumento de la concentración de ascorbato y glutatión, compuestos que permitieron detoxificar los radicales libres. No obstante, dicha respuesta fue dependiente de la especie, del tipo de competencia y del periodo de sequía.

Así, en el caso de *Tp* en monocultivo tras 9 días de sequía, la planta respondió principalmente aumentando la actividad de la SOD, la CAT y la GR (Fig. 6.2) e incrementando la concentración de ascorbato y glutatión (Fig. 6.4). Como se ha visto en el capítulo 5, *Tp* responde a la sequía cerrando los estomas (Fig. 5.1B) con la consiguiente disminución de la concentración interna de CO_2 (Fig. 5.1C). Este hecho reduce la tasa fotosintética (Fig. 5.1A) y la actividad de las enzimas del ciclo de Calvin (Dias & Brüggemann, 2010), lo que disminuye el consumo de NADPH y favorece la reacción de Mehler para poder así disipar el exceso de energía canalizada a través del transporte de electrones tilacoidal (Foyer & Harbinson, 1994). El incremento de la actividad de la reacción de Mehler tiene como consecuencia la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$. El $\text{O}_2^{\cdot-}$ generado puede ser detoxificado por la enzima SOD y/o por metabolitos como el Gsh y el ascorbato (Foyer & Noctor, 2011).

La actividad SOD de *Tp* se incrementó, a la vez que aumentó la concentración de ascorbato y Gsh por un incremento en la proporción de carbohidratos asignados a su síntesis (Fig. 6.5A); estos hechos permitieron a la planta metabolizar el $\text{O}_2^{\cdot-}$. Sin embargo, la enzima APX no vio incrementada su actividad, pudiendo deberse a que su valor constitutivo le permitió detoxificar el H_2O_2 generado. La regeneración del ascorbato oxidado, proveniente de la actividad APX o del contacto directo con el $\text{O}_2^{\cdot-}$, es llevada a cabo por la planta bien por la enzima MDHAR o bien por la enzima DHAR. Alternativamente, dos moléculas de MdhA pueden, espontáneamente, convertirse en una molécula de ascorbato reducido y una molécula de Dha, y esta última, si no es rápidamente reducida por la DHAR, es degradada por la planta, produciendo oxalato o tartrato (Noctor & Foyer, 1998). En este trabajo, ninguna de las dos enzimas regenerantes del ascorbato se vio inducida por la sequía en *Tp* en monocultivo (Fig.

6.2D,E), por lo que al no observarse acumulación de Dha podría deducirse que la planta reduce el Dha a Asa a través de otros mecanismos no contemplados anteriormente como mediante la cesión electrónica del ácido hidrolipoico (Biewenga et al., 1997), o bien degrada el Dha producido y sintetiza *de novo* el ascorbato, pudiendo atribuirse, quizá, este hecho a que, a corto plazo, es más costoso para la planta sintetizar alguna de las dos enzimas regeneradoras del Asa que sintetizar ascorbato *de novo*.

En cambio, la enzima encargada de la regeneración del Gsh sí fue inducida (Fig. 6.2F), lo que unido al hecho de que la síntesis del Gsh es más costosa que la de ascorbato (Noctor et al., 1998), podría indicar que, a corto plazo, para la planta es más beneficiosa la síntesis de ascorbato que su regeneración, mientras que en el caso del Gsh es menos costoso aumentar la síntesis de la GR.

Debido a ello, las mayores tasas de síntesis de ascorbato que de glutatión se explicarían por el menor coste energético en la síntesis del ascorbato con respecto al glutatión. Gest et al. (2013) afirmaron que el ascorbato es una molécula con un bajo coste de síntesis, consumiendo por cada mol de ascorbato un mol de GTP y generándose un mol de NADH y un mol de citocromo reducido partiendo de la glucosa. En contraposición, el glutatión es sintetizado a partir de tres aminoácidos cuya disponibilidad es menor que la de la glucosa necesaria para la síntesis del ascorbato y, además, las enzimas implicadas en convertir los tres aminoácidos en Gsh consumen dos ATP (Noctor et al., 1998).

El incremento de la actividad GR serviría no sólo para regenerar el Gsh y así mantener su función antioxidante, sino, también, para aumentar el consumo del NADPH, evitando la sobrerreducción de la cadena transportadora tilacoidal que se produciría como consecuencia de la disminución de actividad del ciclo de Calvin en condiciones de estrés hídrico, minimizando de esta manera la formación de $O_2^{\cdot -}$ (Bowler et al., 1992).

Como se ha mencionado anteriormente, la disminución de la concentración interna de CO_2 en sequía reduce el cociente CO_2/O_2 , lo que aumenta la fotorrespiración (Noctor et al., 2002; Galmés et al., 2007). Para evitar el daño asociado al H_2O_2

producida por la fotorrespiración en los peroxisomas, Tp aumentó la actividad CAT (Fig. 6.2B), como también han observado varios autores en plantas de cebada y guisante en sequía (Mittler & Zilinskas, 1994; Ahmed et al., 2013).

Por el contrario, cuando el estrés hídrico fue más prolongado (16 días de sequía), además de incrementarse la actividad SOD (Fig. 6.3A) y la concentración de ascorbato en Tp (Fig. 6.6A), también aumentó la actividad de la enzima MDHAR (Fig. 6.3D). De esta manera, al aumentar los niveles de ascorbato, así como su estado de reducción, se incrementaba su participación, tanto directa como antioxidante capaz de destruir los radicales libres, como indirecta a través de la APX, la cual también vio incrementada su actividad (Fig. 6.3C). Esta diferente respuesta en función de la duración de la sequía podría deberse a que la planta requiere de un cierto periodo de tiempo para que se induzcan los sistemas enzimáticos que participan en la respuesta antioxidante (Tausz et al., 2004), mientras que a corto plazo serían los metabolitos antioxidantes los que tendrían un papel predominante.

Tras 16 días de sequía, en contraposición al día 9, la síntesis de Gsh disminuyó, reduciéndose su concentración (Fig. 6.6B). Sin embargo, se destinó una mayor proporción de fotoasimilados para la síntesis de ascorbato que bajo condiciones de buen aporte hídrico, lo que provocó un incremento en su concentración (Fig. 6.7A). Como hemos comentado anteriormente, la síntesis de ascorbato es energéticamente menos costosa que la de Gsh y, al prolongarse la sequía, la planta busca reducir la relación coste/beneficio (Gest et al., 2013). Además, el incremento en la actividad MDHAR reduce la participación del Gsh en la regeneración del ascorbato al utilizar directamente NAD(P)H y no depender del Gsh, reforzando la idea de la menor participación del Gsh debido a su alto coste energético para su síntesis.

Este comportamiento observado cuando las plantas crecieron en monocultivo no se detectó cuando lo hicieron en mezcla, motivado por un diferente estado hídrico del suelo. En el día 9, el mantenimiento del RWC (Fig. 4.2) y la ausencia de caída de la fotosíntesis (Fig. 5.1A) evitaron a la planta la necesidad de inducir el sistema antioxidante (Figs. 6.2 y 6.4). En cambio, tras 16 días de estrés hídrico, cuando el nivel de agua en el suelo era similar en los dos tipos de competencia, el comportamiento de

Tp en mezcla fue similar que en monocultivo (Fig. 6.3; 6.6). Esto es, aumento de la actividad APX, para detoxificar el H_2O_2 , junto al incremento en la actividad MDHAR, para regenerar el ascorbato, a la vez que aumentaba de manera extraordinaria la concentración de ascorbato al aumentar la proporción de fotoasimilados que fueron destinados a la síntesis del ascorbato en comparación con los destinados al crecimiento (Fig. 6.7A).

En Ac, el tratamiento de sequía durante 9 días no produjo cambios en el sistema antioxidante, principalmente debido a que el resto de parámetros fisiológicos analizados no estaban afectados. De hecho, ese periodo de sequía no pareció afectar a la especie, como se deduce de su elevado RWC, que no bajó del 97% (Fig. 4.2).

Por el contrario, en el día 16, cuando el RSWC descendió al 10% sí se observó una caída en el RWC y, en esas circunstancias, se apreciaron cambios en las actividades de algunas enzimas; si bien, tampoco apareció daño oxidativo (Fig. 6.9). Al igual que sucedió en el caso de Tp, la menor conductancia estomática en Ac registrada en sequía, tanto en monocultivo como en mezcla (Fig. 5.2B), redujo el cociente CO_2/O_2 en los cloroplastos, aumentando de esta manera la fotorrespiración (Noctor et al., 2002, Galmés et al., 2007). Para hacer frente al H_2O_2 generada en los peroxisomas la planta aumentó la actividad CAT (Fig. 6.3B), como también observaron Mittler & Zilinskas (1994) y Ahmed et al. (2013). A pesar de que las menores tasas fotosintéticas (Fig. 5.2A) podrían indicar un menor consumo del NADPH y, por tanto, una acumulación de energía en la ferredoxina y una mayor actividad de la reacción de Mehler, Ac no aumentó su actividad SOD como respuesta a la sequía cualquiera que fuera el tipo de competencia, lo que podría indicar que los valores constitutivos de dicha enzima, mayores que los de Tp, son suficientes para detoxificar el $O_2^{\cdot -}$ generado. Por contra, la actividad APX aumentó para metabolizar el H_2O_2 producida por la SOD (Fig. 6.3C). Esta respuesta de aumento de la actividad APX en condiciones de sequía también fue observada por Smirnoff & Colomé (1988) en *Hordeum vulgare* y *Eragrostis tef* y por Farooq et al. (2010) en *Oryza sativa*. Se observaron diferencias en el metabolismo del Asa entre ambos tipos de competencia en respuesta a la sequía. Así, en monocultivo, la concentración de Asa no se vio afectada, si bien su síntesis disminuyó en paralelo con la inhibición del crecimiento de la planta, es decir, la planta mantuvo la misma proporción

de fotoasimilados destinados a la síntesis de ascorbato. Por el contrario, en mezcla, aumentó la concentración de Asa, tanto por aumento de su síntesis como por la reducción de la biomasa, lo que indicaría una mayor asignación de carbohidratos al metabolismo antioxidante que a la formación de biomasa (Fig. 6.7B). La competencia también influyó en la vía de regeneración del ascorbato, concretamente, cuando Ac creció en monocultivo aumentó la actividad DHAR y cuando lo hizo en mezcla incrementó la actividad MDHAR (Fig. 6.3D,E). Este hecho puede estar relacionado con los niveles de glutatión, ya que cuando Ac presentó una mayor concentración de glutatión, es decir, en monocultivo, la regeneración del ascorbato fue a través de la vía de la DHAR que utiliza glutatión, y cuando la concentración de glutatión fue menor la enzima inducida fue la MDHAR. Similares resultados fueron obtenidos por Pérez-López (2008) en cebada.

6.3.4. Efecto de la sequía bajo CO₂ elevado

Bajo condiciones combinadas de sequía y elevado CO₂ se registró la misma tendencia que a CO₂ ambiental, pero atenuada.

Varios autores han afirmado que las plantas crecidas a CO₂ elevado presentan una mayor defensa frente a estreses abióticos (Rao et al., 1995; Schwanz & Polle, 2001; Pérez-López et al., 2009b; 2010b), aunque el efecto beneficioso del elevado CO₂ puede ser diferente en función del grupo funcional, como detectaron AbdElgawad et al. (2015) en un estudio con leguminosas y gramíneas. Sin embargo, algunos autores constataron que el efecto del elevado CO₂ no se debe a unas mayores actividades enzimáticas, sino a una menor generación de ROS (Pérez-López et al., 2009b; Farfan-Vignolo & Asard, 2012). Esta afirmación se corresponde con lo observado en Tp bajo ambos tipos de competencia y en los dos tipos de sequía analizados, ya que las actividades de las enzimas SOD y APX no aumentaron a elevado CO₂, mientras que sí lo hicieron a CO₂ ambiental (Fig. 6.2), y en ambos casos no hubo daño oxidativo en las membranas celulares (Fig. 6.9A).

Tras 9 días de sequía, la concentración de ascorbato de Tp aumentó en respuesta a la sequía, en monocultivo alcanzando valores similares que a CO₂ ambiental y en mezcla con una mayor concentración que a CO₂ ambiental. Esto fue debido a que a pesar de presentar una mayor biomasa, hubo un aumento en la síntesis de ascorbato, que a CO₂ elevado fue superior en ambos tipos de competencia que a CO₂ ambiental (Fig. 6.5A), gracias a la mayor concentración de glucosa (Fig. 5.9A) que es su molécula precursora (Gest et al., 2013).

En general, no existieron diferencias entre tratamientos de competencia en Tp en condiciones de sequía homogénea (día 16). La única enzima que vio inducida su actividad fue la MDHAR que mostró un comportamiento similar que bajo CO₂ ambiental, es decir, en el día 9 no se vio inducida, pero en el día 16 sí. Otros autores también observaron un incremento de la actividad MDHAR en condiciones de sequía y elevado CO₂ en leguminosas como *Medicago lupulina* (Farfan-Vignolo & Asard, 2012).

La concentración de ascorbato aumentó en condiciones de déficit hídrico, lo que se debió tanto a un aumento de su síntesis como a una disminución de la biomasa (Fig. 6.7A), confirmando de nuevo que, bajo condiciones de estrés, la asignación de fotoasimilados aumenta para proteger a la planta del daño oxidativo a costa de disminuir la proporción destinada al crecimiento. Sin embargo, si se comparan con los resultados obtenidos a CO₂ ambiental, la concentración de ascorbato a elevado CO₂ fue inferior que la registrada a CO₂ ambiental, lo que nos indica que, a pesar de poseer más energía y azúcares para la síntesis de ascorbato a elevado CO₂, Tp no necesitaba sintetizar tanto ascorbato debido a la menor generación de ROS mencionada anteriormente y a la inducción de la enzima MDHAR que permitió regenerar el ascorbato oxidado. Por tanto, Tp destinó una menor proporción de fotoasimilados a la síntesis de ascorbato que a CO₂ ambiental (Fig. 6.7A), permitiendo destinar mayor proporción de fotoasimilados a otros procesos fisiológicos como el crecimiento (capítulo 7).

En general, el metabolismo antioxidante de Ac bajo sequía progresiva (día 9), no se vio afectado (Figs. 6.2, 6.4, y 6.8); sin embargo, analizando los gráficos GVA se observó un incremento en la proporción de fotoasimilados destinados a la síntesis de

compuestos antioxidantes como el ascorbato cuando Ac creció en mezcla, mientras que en monocultivo no hubo diferencias en la proporción de fotoasimilados destinados a la síntesis de ascorbato (Fig. 6.5B). Esto pudo deberse a que el RSWC (Fig. 4.1) fue mayor en monocultivo que en mezcla. Además, conviene recordar que la sequía a elevado CO₂ provocó un mayor descenso en el RWC de Ac en mezcla en comparación con las plantas crecidas a CO₂ ambiental (Fig. 4.2), indicando una mayor competitividad de Tp. Ese mayor deterioro del estado hídrico de la planta pudo desencadenar este primer paso en la respuesta antioxidante. Esto podría estar relacionado, tal y como se comentaba para el caso de Tp, con la respuesta temprana de adaptación a las condiciones de sequía; es decir, primero a través de la síntesis de compuestos antioxidantes y, a medida que la sequía se prolongaba, con la inducción enzimática.

Cuando la sequía fue homogénea entre tratamientos de Ac (día 16) existieron diferencias entre monocultivo y mezcla (Figs. 6.3, 6.6, y 6.9). Por un lado, en monocultivo, la planta presentó un comportamiento similar que a CO₂ ambiental, aunque, en general, la actividad de las enzimas fue menor a elevado CO₂ que a CO₂ ambiental, debido a la menor generación de ROS a elevado CO₂ (Pérez-López et al., 2009b; Farfan-Vignolo & Asard, 2012). Además, a pesar de que como respuesta a la sequía la planta cierra los estomas y reduce la entrada de CO₂ en los cloroplastos, la mayor concentración externa a elevado CO₂ provocó una mayor entrada de CO₂ y un mayor cociente CO₂/O₂, lo que redujo la producción de H₂O₂ en los peroxisomas, por lo que la planta no indujo la actividad CAT, siendo esta respuesta también observada por otros autores (Pérez-López et al., 2009b).

Por otro lado, cuando Ac creció en competencia con Tp, se observó daño oxidativo en las membranas de Ac, como evidenció su mayor concentración de Mda (Fig. 6.9), lo que corrobora la hipótesis de partida de que cuando las plantas crecieran en mezcla, Ac iba a estar más expuesta al estrés oxidativo. En este sentido, como se ha visto en los capítulos 4 y 5, el efecto de la sequía sobre Ac en mezcla fue mayor a elevado CO₂ que a CO₂ ambiental debido a que el mayor incremento de la biomasa radical de Tp a elevado CO₂ redujo la capacidad de absorción de agua de Ac, provocando un menor Ψ_{wmd} (Fig. 4.5B) para intentar mantener la toma de agua. El

fuerte descenso de la tasa fotosintética (Fig. 5.2A) redujo el consumo de NADPH lo que provocó un aumento de la reacción de Mehler; sin embargo, la actividad SOD no fue inducida (Fig. 6.3A). Varios autores han observado que cuando la sequía es muy severa la actividad SOD no es inducida, aumentando notablemente la concentración de Mda (Pompelli et al., 2010).

A pesar de que la actividad SOD se mantuvo constante, la actividad APX se incrementó (Fig. 6.3C) como consecuencia, quizá, de un aumento de la concentración de H₂O₂, proveniente de fuentes distintas a la acción de la SOD. Las reacciones enzimáticas que generan H₂O₂ en respuesta a estímulos específicos no están completamente definidas, incluyéndose entre dichas fuentes las enzimas NADPH oxidasa, oxalato oxidasa, peroxidasas de la pared celular y otras oxidasas (Bolwell & Wojtaszek, 1997; Bolwell et al., 2002). Pérez-López et al. (2010b) registraron que las plantas crecidas a elevado CO₂ presentaban mayor concentración de H₂O₂ que a CO₂ ambiental, lo que podría explicar la mayor actividad APX observada en Ac cuando crecía en mezcla a elevado CO₂.

Las actividades de las enzimas MDHAR y GR aumentaron en Ac en mezcla como respuesta al déficit hídrico a elevado CO₂ (Fig. 6.3), reforzando la idea de que a largo plazo la planta induce el sistema enzimático para la regeneración del ascorbato. Además, en comparación con el día 9, la síntesis de ascorbato se redujo (Fig. 6.7B).

A pesar del aumento de las actividades APX, MDHAR y GR y del aumento de la concentración de ascorbato reducido, Ac en mezcla no fue capaz de metabolizar las ROS, provocando, en último término, daño oxidativo (Fig. 6.9).

6.4. Conclusions

- The competition caused by Tp towards Ac in mixture made that, even under well-watered conditions, the photochemical activity of Ac was affected, which caused an increase in SOD activity, in order to prevent oxidative damage.
- The elevated CO₂, under well-watered conditions, produced a relaxation effect on the antioxidant system by a lower generation of ROS.
- Drought did not produce at ambient CO₂ oxidative damage in any treatment thanks to the induction of the antioxidant metabolism. However, there were differences in the antioxidant response to drought dependent on the drought period. Thus, when the stress period was short, the plant increased the synthesis of metabolites. In contrast, when the drought period was prolonged, the plant increased the activity of regenerating enzymes, seeking to reduce the cost/benefit ratio.
- Under combined conditions of elevated CO₂ and drought, the elevated CO₂ did not benefit plants through a more developed antioxidant system, but by a smaller generation of ROS.
- The higher competitiveness of Tp for water uptake, at elevated CO₂ in mixture and homogeneous drought conditions, caused a greater generation of ROS in Ac, because of the reduced consumption of NADPH due to a decline in the photosynthetic rate. Ac was not able to induce an effective enough antioxidant system to metabolize the ROS generated, ultimately causing oxidative damage.

7. Crecimiento y calidad

7.1. Introducción

El crecimiento se define como el incremento en biomasa seca, volumen, longitud o área y, generalmente, implica división, expansión y diferenciación de las células (Lambers et al., 2008). Por un lado, el incremento de biomasa implica la deposición de masa en las células y, teniendo en cuenta que entre un 85-95% de la biomasa vegetal seca consiste en compuestos basados en carbono (Poorter & Villar, 1997), la mayor parte de dicha masa proviene de la fotosíntesis (capítulo 5). Por otro lado, el aumento del área foliar depende de la expansión celular que, en parte, está condicionada por la síntesis de nuevos compuestos de la pared y por la turgencia celular que genera la fuerza necesaria para la extensión y elongación de la pared celular primaria (Taiz, 1984; Taiz & Zeiger, 2010). Como se ha visto en el capítulo 4, la turgencia está influida por el contenido de agua y el potencial osmótico.

Brouwer (1962a, b; 1963) describió la teoría del equilibrio funcional, que consiste en que las plantas distribuyen los nutrientes hacia el órgano responsable de la toma del nutriente limitante y, aunque el mecanismo por el cual se produce no está clarificado, algunos autores citan a la sacarosa y a las citoquininas como los principales agentes señalizadores (Lambers, 1983; Farrar, 1992; van der Werf & Nagel, 1996).

Para realizar una correcta comparación de la respuesta del crecimiento frente a estreses ambientales, se utiliza la tasa relativa de crecimiento (RGR) que permite la comparación entre procesos con diferente escala temporal y/o biomasa inicial (Lambers et al., 1989). El RGR puede ser dividido en el componente funcional (tasa de asimilación neta; NAR) y en el componente morfológico (relación de área foliar; LAR), pudiendo este último, a su vez, ser dividido en el área foliar específica (SLA) y en la relación de masa foliar (LWR).

El NAR se puede interpretar como un buen indicador de la fotosíntesis neta de la planta entera por unidad de superficie durante un periodo de crecimiento determinado y no como un momento puntual como ocurre con la medida de la fotosíntesis (Poorter & Van der Werf, 1998).

El SLA es un parámetro que indica el grosor de las hojas y, por tanto, la capacidad de interceptar la luz por unidad de peso foliar (Poorter & Pérez-Soba, 2002). El LWR, por su parte, es un indicador de la biomasa que es destinada a las hojas con respecto a la biomasa vegetal total (Poorter & Nagel, 2000).

En relación al papel de los factores ambientales en el crecimiento, es de destacar que existen numerosos estudios que han mostrado un incremento en la biomasa vegetal de diversas especies frente a un aumento de la concentración de CO₂ atmosférica (Kimball, 1983; Poorter, 1993; Atkin et al., 1999; Poorter & Nagel, 2000; Poorter & Pérez-Soba, 2002; Poorter & Navas, 2003; Pérez-López et al., 2013b). Este hecho, en general, no se debería a un efecto permanente sobre el RGR, sino a un aumento temporal del mismo en las etapas iniciales del desarrollo (Poorter, 1993; Poorter & Pérez-Soba, 2002; Pérez-López et al., 2013a). Como se ha mencionado anteriormente, el RGR depende, por un lado, del componente funcional NAR y, por otro lado, del componente morfológico LAR que a su vez se divide en el SLA y el LWR. Poorter & Nagel (2000), en un análisis de 50 estudios publicados, observaron que el elevado CO₂ causa un incremento del NAR por un aumento de la tasa fotosintética, a la vez que una reducción del SLA por una acumulación de carbohidratos no estructurales.

Por otro lado, como se ha señalado en los capítulos anteriores, el déficit hídrico, por lo general, suele causar tanto un cierre estomático, reduciendo la capacidad fotosintética, como un menor contenido hídrico de la planta, lo que se traduce en la pérdida de la turgencia celular si la planta no es capaz de adaptarse al déficit hídrico mediante ajuste osmótico. Estos son los dos procesos fundamentales para que se produzca el crecimiento vegetal y, por lo tanto, cabe esperar un descenso en la biomasa vegetal en plantas sometidas a sequía, como ha sido observado por varios autores (Boyer, 1968; Hsiao, 1973; Hsiao et al., 1976). Este descenso en el crecimiento no es uniforme entre los diferentes órganos vegetales. Así, siguiendo con la teoría del

equilibrio funcional de Brouwer, las plantas en condiciones de sequía invertirán mayor proporción de fotoasimilados en la parte subterránea para intentar captar más agua, aumentando así la contribución relativa de la raíz a la biomasa total (Poorter & Nagel, 2000).

Existen, además, varios estudios que afirman que, cuando se dan conjuntamente condiciones de elevado CO₂ y sequía, el elevado CO₂ mitiga parcialmente la reducción del crecimiento, a través de unas mayores tasas fotosintéticas y una mejor conservación del agua por cierre estomático (De Luis et al., 1999; Volk et al., 2000; Morgan et al., 2004; Robredo et al., 2007; Soussana et al., 2007).

Este comportamiento a nivel de individuos se hace más complejo cuando se considera la interacción entre plantas. En los ecosistemas naturales, las plantas coexisten con otras, tanto de la misma como de otras especies. Esta coexistencia implica competencia entre ellas por los recursos disponibles como el agua, los elementos minerales o la luz (Van der Werf *et al.* 1993; Warwick *et al.* 1998), y la habilidad de captar estos recursos determinará en último término la capacidad que tendrán las plantas para crecer. Mientras que en ambientes con alta disponibilidad de agua y nutrientes minerales, la competencia está marcada por la captación de luz (Schwinning & Parsons, 1996), en condiciones de sequía, la predominancia de unas especies frente a otras viene determinada por la capacidad de tomar agua, ya sea por una mayor biomasa radical o por un sistema de toma más eficiente (Eissenstat & Caldwell, 1988; Gordon et al., 1989; Melgoza et al., 1990; D'Antonio & Mahall, 1991; D'Antonio & Vitousek, 1992; Cabin et al., 2002). A este respecto, varios estudios han analizado la competencia entre leguminosas y gramíneas y, aunque los resultados no son concluyentes, se han observado tanto incrementos del crecimiento de las leguminosas (Zhang et al., 2008; Zhang et al., 2009) como de las gramíneas (Lucero et al., 1999; Munoz & Weaver, 1999) cuando las plantas crecían en mezcla. Dicha competencia entre ambos grupos funcionales (leguminosas y gramíneas) es de importancia destacable en el caso de los pastos consumidos por el ganado.

En la alimentación ganadera, no sólo es importante la producción vegetal, sino que también lo es la calidad del forraje. Calidad que viene definida, entre otros

parámetros, por la digestibilidad de la materia vegetal y por el contenido en nitrógeno (Akin, 1989; Owensby et al., 1996).

Varios autores han observado un descenso en la calidad del forraje en plantas crecidas bajo elevado CO₂ debido a una menor concentración de nitrógeno (Owensby et al., 1996; Campbell & Stafford Smith, 2000; Taub et al., 2008) y a una reducción de la digestibilidad (Morgan et al., 2004). Sin embargo, otros autores no han encontrado diferencias en la digestibilidad de plantas crecidas a elevado CO₂ frente a plantas crecidas a CO₂ ambiental en trébol blanco (Frehner et al., 1997) y en sorgo (Akin et al., 1994). Picon-Cochard et al. (2004), incluso, registraron en comunidades pascícolas un incremento de la digestibilidad debido a un aumento en la concentración de azúcares solubles y a una reducción en la concentración de fibras.

El estrés hídrico provoca, por un lado, un descenso en la concentración de nitrógeno foliar (Robredo et al., 2011), lo que se traduciría en una reducción de la calidad forrajera, pero, por otro lado, causa un aumento de la digestibilidad (Akin et al., 1994), lo que implica una mayor calidad del pasto.

A la vista de estos antecedentes, el objetivo general de este capítulo es el análisis del crecimiento, la producción y la calidad forrajera, estudiando el efecto de la sequía, el elevado CO₂ y la competencia entre *Agrostis capillaris* y *Trifolium pratense*, así como la influencia de la sequía y el elevado CO₂ sobre la competencia entre ambas especies. Para ello, se ha dividido este objetivo general en cinco objetivos parciales:

- Determinar el efecto del incremento de la concentración de CO₂ en la producción y calidad forrajera de pastos en condiciones de buen aporte hídrico.
- Examinar la producción y calidad y determinar la diferente respuesta entre las especies sometidas a sequía progresiva.
- Estudiar el crecimiento y la calidad forrajera cuando el nivel de sequía es idéntico en todos los tratamientos (sequía homogénea).
- Evaluar el efecto de la sequía bajo elevado CO₂ en la producción y calidad de especies pratenses.

- Estudiar y cuantificar la competencia entre las dos especies pratenses frente a los distintos factores ambientales.

Con estos objetivos, las hipótesis de partida son: 1) el elevado CO₂ aumentará la producción vegetal por incremento de la tasa fotosintética y reducción de la fotorrespiración; sin embargo, se reducirá la calidad del forraje debido a una menor concentración de nitrógeno foliar. 2) La sequía reducirá la producción de biomasa por la disminución de la tasa fotosintética y por el descenso del potencial de turgencia, mientras que el efecto sobre la calidad no será unidireccional, por un lado, la sequía disminuirá la concentración de nitrógeno por las menores tasas transpiratorias, pero, por otro lado, la digestibilidad aumentará por la acumulación de azúcares solubles como osmolitos y la menor concentración de fibras. 3) Debido al mayor requerimiento hídrico de Tp por su mayor tamaño, la sequía tendrá una mayor influencia sobre dicha especie que sobre Ac cuando crezcan en monocultivo. 4) En condiciones combinadas de elevado CO₂ y sequía, el efecto negativo de la sequía se verá paliado parcialmente, gracias a la menor pérdida de agua a elevado CO₂ y a las mayores tasas fotosintéticas. 5) La competencia entre ambas especies generará una gran presión sobre Ac, reduciendo su crecimiento, debido a la morfología foliar de Tp, que le permitiría una mayor captación de la energía lumínica.

7.2. Resultados

7.2.1. Crecimiento absoluto en sequía progresiva

En la figura 7.1A se representan los cambios ocurridos tras 9 días de sequía en la biomasa total bajo las distintas condiciones de crecimiento. En condiciones de buen aporte hídrico, la biomasa total fue superior en Tp que en Ac, 3 veces mayor en monocultivo y 16 veces mayor en mezcla, independientemente de la concentración de CO₂ (Tabla 7.11). La competencia afectó a ambas especies, sin embargo, la dirección del efecto fue opuesta; así, Tp vio su crecimiento incrementado en mezcla, un 35% cualquiera que fuera la concentración de CO₂ en condiciones de buen aporte hídrico. En cambio, Ac mostró una reducción de su biomasa total en mezcla, alrededor de un 65%, independientemente de la concentración de CO₂.

El aumento de la concentración de CO₂ provocó una mayor acumulación de biomasa en Tp, un 30% en ambos tipos de competencia, mientras que en Ac hubo diferencias en el efecto del incremento de la concentración de CO₂ en función de la competencia. Así, en monocultivo aumentó un 30% y en mezcla un 47%. Tras 9 días de sequía el crecimiento total de Tp descendió un 27% en monocultivo y un 22% en mezcla, bajo condiciones de CO₂ ambientales. Por el contrario, en condiciones combinadas de elevado CO₂ y sequía, no se observaron variaciones en el crecimiento en mezcla, y en monocultivo la diferencia fue menor que a CO₂ ambiental, un 17%. En Ac, la sequía sólo afectó al crecimiento en monocultivo, con una reducción alrededor del 20%, independientemente de la concentración de CO₂.

La biomasa aérea mostró un patrón similar a la biomasa foliar y caulinar. La biomasa aérea de Tp en monocultivo en condiciones de buen aporte hídrico y a CO₂ ambiental fue de 1,38 g DW, que se dividía en 0,63 g DW de hojas y 0,75 g DW de tallos. La biomasa aérea de Ac fue un 73% inferior que la de Tp, 0,37 g DW: 0,27 g DW de hojas y 0,10 g DW de tallos (Fig. 7.1B-D). Como ocurrió en la biomasa total, la competencia produjo efectos opuestos en las dos especies, por un lado, incrementó la biomasa aérea un 35% en Tp, a través de un aumento de la biomasa foliar del 43% y de

la caulinar un 29%. Por otro lado, la competencia disminuyó un 70% ambos órganos aéreos en Ac cuando crecieron en mezcla.

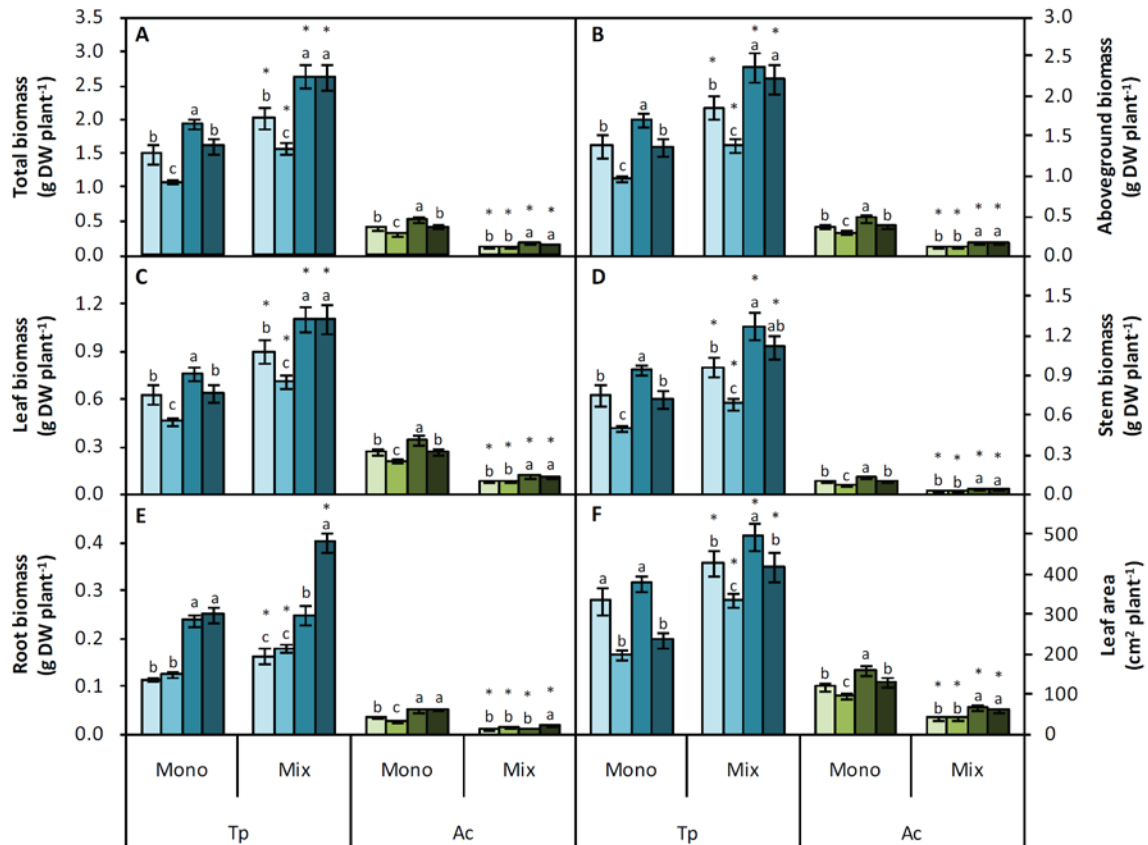


Fig. 7.1. Effects of drought, CO₂, and competition in the 9th day on total biomass (A), aboveground biomass (B), leaf biomass (C), stem biomass (D), root biomass (E), and leaf area (F). Lightest bars represent well-watered plants at ambient CO₂, light bars represent drought plants at ambient CO₂, dark bars represent well-watered plants at elevated CO₂, and darkest bars represent drought plants at elevated CO₂. Tp denotes *Trifolium pratense*; Ac, *Agrostis capillaris*; Mono, monoculture; Mix, mixture. Different letters indicate significant differences at $P \leq 0.05$ within the same species and type of competition. * indicates differences within the same species between monoculture and mixture.

El elevado CO₂ aumentó la biomasa aérea en las dos especies, sin embargo, la magnitud del efecto fue dependiente de la especie y del tipo de competencia. Así, en Tp los incrementos fueron alrededor del 25% en monocultivo para los dos órganos aéreos y, en mezcla, del 22% en la biomasa de hojas y del 32% en la de tallos, que se tradujeron en un aumento del 28% en la biomasa aérea. Por contra, en Ac, los cambios debidos al incremento de la concentración atmosférica de CO₂ fueron mayores. En

monocultivo, la biomasa aérea aumentó un 28% en cada órgano; mientras que, en mezcla, el incremento fue del 47% en la biomasa foliar y del 65% en la biomasa caulinar, lo que se tradujo en una biomasa aérea un 51% superior que bajo CO₂ ambiental.

La sequía produjo a CO₂ ambiental un descenso en la acumulación de biomasa aérea en Tp, del 30% en monocultivo y del 25% en mezcla, en porcentajes similares entre órganos; en cambio, en Ac, la biomasa aérea sólo se vio afectada por la sequía en monocultivo, donde se redujo un 22% con descensos equivalentes en ambos órganos aéreos. El elevado CO₂ mitigó el efecto de la sequía en Tp en monocultivo, reduciéndose la biomasa aérea menos que a CO₂ ambiental, un 20%, mientras que en mezcla contrarrestó por completo el efecto de la sequía. Por el contrario, en el caso de Ac, no hubo diferencias en el efecto de la sequía entre las plantas que crecieron en sequía a CO₂ ambiental y a CO₂ elevado.

El comportamiento de la biomasa radical frente a los diversos tratamientos se muestra en la figura 7.1E. En condiciones de buen aporte hídrico y bajo CO₂ ambiental, la biomasa radical de Tp fue 3,3 veces superior a la de Ac, concretamente 0,116 g DW frente a 0,035 g DW. La competencia tuvo efectos opuestos en función de la especie, así en Tp aumentó la biomasa un 41% a CO₂ ambiental, pero no se observó efecto a CO₂ elevado. En el caso de Ac, la competencia disminuyó la biomasa radical un 65% a CO₂ ambiental y un 75% a CO₂ elevado.

El elevado CO₂ *per se* incrementó la biomasa radical en condiciones de buen aporte hídrico en Tp en ambos tipos de competencia, un 106% en monocultivo y un 51% en mezcla, mientras que en Ac sólo la aumentó en monocultivo, un 46%. Tras 9 días de sequía la biomasa radical de Tp no se vio afectada a CO₂ ambiental, pero sí a CO₂ elevado, donde la biomasa radical en mezcla se incrementó un 61%. En Ac, la sequía redujo la biomasa radical en monocultivo un 23% a CO₂ ambiental, pero no a CO₂ elevado, mientras que en mezcla sólo se observó efecto a CO₂ elevado, que incrementó la biomasa radical un 60%.

El área foliar de Tp fue muy superior al de Ac en monocultivo bajo buen aporte hídrico, alrededor de 2,5 veces mayor cualquiera que fuera la concentración de CO₂ (Fig. 7.1F). Cuando las plantas crecieron en mezcla en condiciones de buen aporte hídrico, el área foliar de Tp se incrementó un 30% bajo ambas concentraciones de CO₂; en cambio, en Ac se observó el efecto opuesto, es decir, en mezcla, el área foliar fue un 60% inferior, independientemente de la concentración de CO₂. En condiciones de buen aporte hídrico, el aumento de la concentración de CO₂ incrementó el área foliar de Ac un 34% y un 57% en monocultivo y mezcla, respectivamente, mientras que en Tp sólo en mezcla, un 16%. La sequía bajo CO₂ ambiental disminuyó el área foliar de Tp un 40% en monocultivo y un 21% en mezcla. En el caso de Ac, la sequía redujo el área foliar un 20% en monocultivo, no viéndose afectada en mezcla. En condiciones combinadas, el efecto de la sequía sobre Tp fue ligeramente inferior que bajo CO₂ ambiental, un 37% y un 15% para el monocultivo y la mezcla, respectivamente. En cambio, en Ac la respuesta fue similar que bajo CO₂ ambiental.

La contribución de cada órgano a la biomasa total fue desigual entre especies (Tabla 7.1). Ac mostró la mayor proporción de hojas, aproximadamente un 66%, frente al 43% que presentó Tp. Por otro lado, en Tp se registró una mayor contribución de los tallos, aproximadamente un 48% de la biomasa de Tp y un 25% en el caso de Ac. En la contribución de las raíces, la diferencia entre especies fue dependiente de la concentración de CO₂, el régimen hídrico y la competencia (Tabla 7.11). En condiciones de buen aporte hídrico, la competencia provocó un incremento del 5% en la contribución de hojas en Tp bajo ambas concentraciones de CO₂. A su vez, la competencia interespecífica a CO₂ ambiental redujo la proporción de tallos un 5% en Tp y un 10% en Ac, mientras que a CO₂ elevado provocó un descenso del 22% de la contribución de las raíces en Ac en comparación con el monocultivo.

El aumento de la concentración de CO₂ disminuyó la contribución de las hojas en Tp, un 7% en monocultivo y un 6% en mezcla, mientras que aumentó la proporción de raíces en monocultivo un 55%. En Ac, el elevado CO₂ no provocó ningún efecto significativo en monocultivo, si bien en mezcla aumentó la proporción de tallos un 17% y redujo la de raíces un 24%. La sequía a CO₂ ambiental disminuyó un 8% la contribución de los tallos en Tp en mezcla, pero no en monocultivo. La sequía también

provocó un incremento de la contribución de las raíces a la biomasa total en Tp, alrededor del 45% en ambos tipos de competencia. En el caso de Ac, la sequía no produjo diferencias en las contribuciones de cada órgano.

Cuando ambos factores ambientales se dieron conjuntamente, en Tp la contribución de los tallos descendió en ambos tipos de competencia aproximadamente un 10%, mientras que el efecto estimulador sobre la contribución de las raíces fue inferior al obtenido a CO₂ ambiental en monocultivo (30%) y superior en mezcla (59%). En Ac, al contrario de lo que ocurrió a CO₂ ambiental, a elevado CO₂ se observó un incremento en la contribución de las raíces, concretamente, un 26% en monocultivo y un 58% en mezcla.

Table 7.1. Effects of drought, CO₂, and competition on leaf contribution (LC; %), stem contribution (SC; %), and root contribution (RC; %) in the 9th day. Tp denotes *Trifolium pratense*; Ac, *Agrostis capillaris*; Mono, monoculture; Mix, mixture; D, drought; WW, well-watered. Different letters along the same row indicate significant differences within each species ($P \leq 0.05$). * indicates differences within the same species between monoculture and mixture.

| | | Tp | | | | Ac | | | |
|-----|---------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | |
| | | WW | D | WW | D | WW | D | WW | D |
| LC | Mono | 42.2 \pm 0.7 ^a | 42.2 \pm 0.5 ^a | 39.3 \pm 1.2 ^b | 39.4 \pm 1.0 ^b | 66.1 \pm 1.0 ^a | 66.6 \pm 0.7 ^a | 65.0 \pm 1.3 ^{ab} | 63.3 \pm 0.8 ^b |
| (%) | Mixture | 44.4 \pm 0.8 ^{a*} | 44.8 \pm 0.8 ^{a*} | 41.9 \pm 1.0 ^{b*} | 41.7 \pm 0.9 ^{b*} | 67.6 \pm 1.5 ^a | 64.7 \pm 1.3 ^{ab} | 66.4 \pm 1.4 ^{ab} | 63.5 \pm 1.2 ^b |
| SC | Mono | 49.8 \pm 0.7 ^a | 46.1 \pm 0.7 ^{ab} | 48.3 \pm 0.6 ^a | 44.4 \pm 1.1 ^b | 24.7 \pm 1.1 ^a | 24.6 \pm 0.6 ^a | 24.7 \pm 1.1 ^a | 23.8 \pm 0.8 ^a |
| (%) | Mixture | 47.4 \pm 0.8 ^{a*} | 43.4 \pm 0.8 ^{b*} | 48.1 \pm 1.2 ^a | 42.4 \pm 1.0 ^b | 22.0 \pm 1.2 ^{b*} | 23.2 \pm 1.2 ^{ab} | 25.7 \pm 0.8 ^a | 23.9 \pm 1.1 ^{ab} |
| RC | Mono | 8.1 \pm 0.7 ^c | 11.7 \pm 0.7 ^b | 12.5 \pm 1.0 ^b | 16.2 \pm 1.2 ^a | 9.2 \pm 0.9 ^b | 8.8 \pm 0.7 ^b | 10.3 \pm 1.0 ^b | 12.9 \pm 0.9 ^a |
| (%) | Mixture | 8.2 \pm 0.7 ^c | 11.8 \pm 1.0 ^b | 10.0 \pm 1.3 ^{bc} | 15.9 \pm 1.0 ^a | 10.4 \pm 1.1 ^a | 12.1 \pm 1.1 ^{a*} | 7.9 \pm 0.9 ^{b*} | 12.5 \pm 0.8 ^a |

El rendimiento (producción de biomasa aérea por unidad de superficie) varió entre los tipos de cultivo el día 9. Bajo buen aporte hídrico y CO₂ ambiental, el mayor rendimiento se registró en el monocultivo de Tp, seguido de la mezcla y el monocultivo de Ac que fueron un 29% y un 73%, respectivamente, frente al monocultivo de Tp (Tabla 7.2). El aumento de la concentración de CO₂ incrementó el rendimiento de todos

los tipos de cultivos aproximadamente un 25%, por lo que las diferencias entre ellos se mantuvieron. La sequía disminuyó el rendimiento de todos los tipos de cultivos, pero en este caso afectó de manera diferente a cada tipo de cultivo. A CO₂ ambiental, el monocultivo de Tp presentó el mayor rendimiento, seguido de la mezcla que fue un 22% inferior y del monocultivo de Ac que fue un 70% inferior. A elevado CO₂ no se detectaron diferencias significativas entre el monocultivo de Tp y la mezcla, pero el monocultivo de Ac siguió mostrando un menor rendimiento, aproximadamente un 73% menor.

Table 7.2. Effects of type of culture on yield (t ha⁻¹) in the 9th day. Tp denotes *Trifolium pratense*; Ac, *Agrostis capillaris*; D, drought; WW, well-watered. Different letters along the same column indicate significant differences within each environmental condition ($P \leq 0.05$).

| | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | |
|-------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | WW | D | WW | D |
| Monoculture of Tp | 4.78 \pm 0.51 ^a | 3.34 \pm 0.14 ^a | 5.92 \pm 0.27 ^a | 4.72 \pm 0.37 ^a |
| Mixture | 3.41 \pm 0.28 ^b | 2.61 \pm 0.16 ^b | 4.41 \pm 0.34 ^b | 4.11 \pm 0.33 ^a |
| Monoculture of Ac | 1.28 \pm 0.11 ^c | 1.00 \pm 0.07 ^c | 1.64 \pm 0.15 ^c | 1.29 \pm 0.10 ^b |

7.2.2. Crecimiento absoluto en sequía homogénea

Tras 16 días de crecimiento, cuando todos los cultivos alcanzaron similar grado de sequía en el suelo, la biomasa total de Tp fue 3,46 g DW en monocultivo y 3,74 g DW en mezcla en condiciones de buen aporte hídrico y CO₂ ambiental (Fig. 7.2A). Ac presentó valores inferiores a los registrados por Tp, un 78% menor en monocultivo y un 94% en mezcla, concretamente 0,80 g DW y 0,23 g DW, en monocultivo y mezcla, respectivamente. La competencia no modificó significativamente la biomasa total de Tp a CO₂ ambiental y buen aporte hídrico, mientras que, en el caso de Ac, la biomasa total disminuyó en mezcla un 71% en las mismas condiciones.

El elevado CO₂ aumentó la biomasa total de las dos especies y bajo ambos tipos de competencia. En Tp los incrementos fueron del 29% en monocultivo y del 54% en

mezcla, mientras que en Ac fueron del 48% y del 66%, respectivamente. La sequía disminuyó la biomasa total de Tp en monocultivo un 59%, cualquiera que fuera la concentración de CO₂, mientras que en mezcla el descenso fue dependiente de la concentración de CO₂, registrándose un descenso del 44% a CO₂ ambiental y del 37% a CO₂ elevado. En el caso de Ac, tras 16 de días de sequía la biomasa total en monocultivo descendió un 22% independientemente de la concentración de CO₂. En cambio, en mezcla, las reducciones causadas por la sequía fueron dependientes de la concentración, un 29% a CO₂ ambiental y un 49% a CO₂ elevado.

La biomasa aérea de Tp fue superior a la de Ac, 4,3 veces en monocultivo y 16 veces en mezcla, siendo esta diferencia causada por una mayor biomasa foliar (2,5 y 10 veces, respectivamente) y caulinar (8 y 34 veces, respectivamente) bajo condiciones de buen aporte hídrico y CO₂ ambiental (Fig. 7.2B-D). La competencia afectó a la biomasa aérea de Ac, disminuyéndola un 70% en mezcla, cualquiera que fuera la concentración de CO₂, en similar proporción para hojas y tallos. En cambio, en Tp, la competencia sólo afectó la biomasa aérea bajo CO₂ elevado, donde incrementó la biomasa aérea y de cada órgano alrededor de un 23% en mezcla.

El elevado CO₂ aumentó la biomasa de los órganos aéreos, pero la magnitud del efecto fue dependiente de la especie, el tipo de competencia y el órgano. Así, en Tp en monocultivo, el incremento de ambos órganos fue del 26%, mientras que en mezcla se observaron diferencias entre los órganos aéreos, aumentando la biomasa foliar un 42% y la caulinar un 58%, resultando finalmente en un incremento de la biomasa aérea del 50%. En Ac, el elevado CO₂ aumentó la biomasa foliar un 33% en monocultivo y un 55% en mezcla y la biomasa caulinar un 44% en monocultivo y un 92% en mezcla. Estos incrementos provocaron que la biomasa aérea fuera un 36% y un 65% superior a CO₂ elevado que a CO₂ ambiental para el monocultivo y la mezcla, respectivamente.

La sequía disminuyó la biomasa aérea de ambas especies. En el caso de Tp no hubo diferencias en los porcentajes de caídas entre órganos, siendo del 62% en monocultivo y del 48% en mezcla a CO₂ ambiental y a CO₂ elevado del 61% y del 40% en monocultivo y mezcla, respectivamente. En Ac los descensos fueron, en general, menores que en Tp. A CO₂ ambiental, la sequía disminuyó la biomasa foliar y caulinar

un 28% en monocultivo, reduciéndose, por tanto, la biomasa aérea un 28%. En cambio, a CO₂ elevado sí hubo diferencias entre órganos, así, la sequía disminuyó la biomasa foliar de Ac un 28% y la caulinar un 22%, provocando un descenso de la biomasa aérea del 26%. En mezcla, el efecto negativo de la sequía sobre el crecimiento de Ac fue mayor que en monocultivo a CO₂ ambiental, disminuyendo la biomasa foliar un 34% y la caulinar un 20%, lo que se reflejó en un descenso del 30% de la biomasa aérea. A elevado CO₂ las diferencias provocadas por la sequía fueron mayores, del 51%, 40% y 48% para la biomasa foliar, caulinar y aérea, respectivamente.

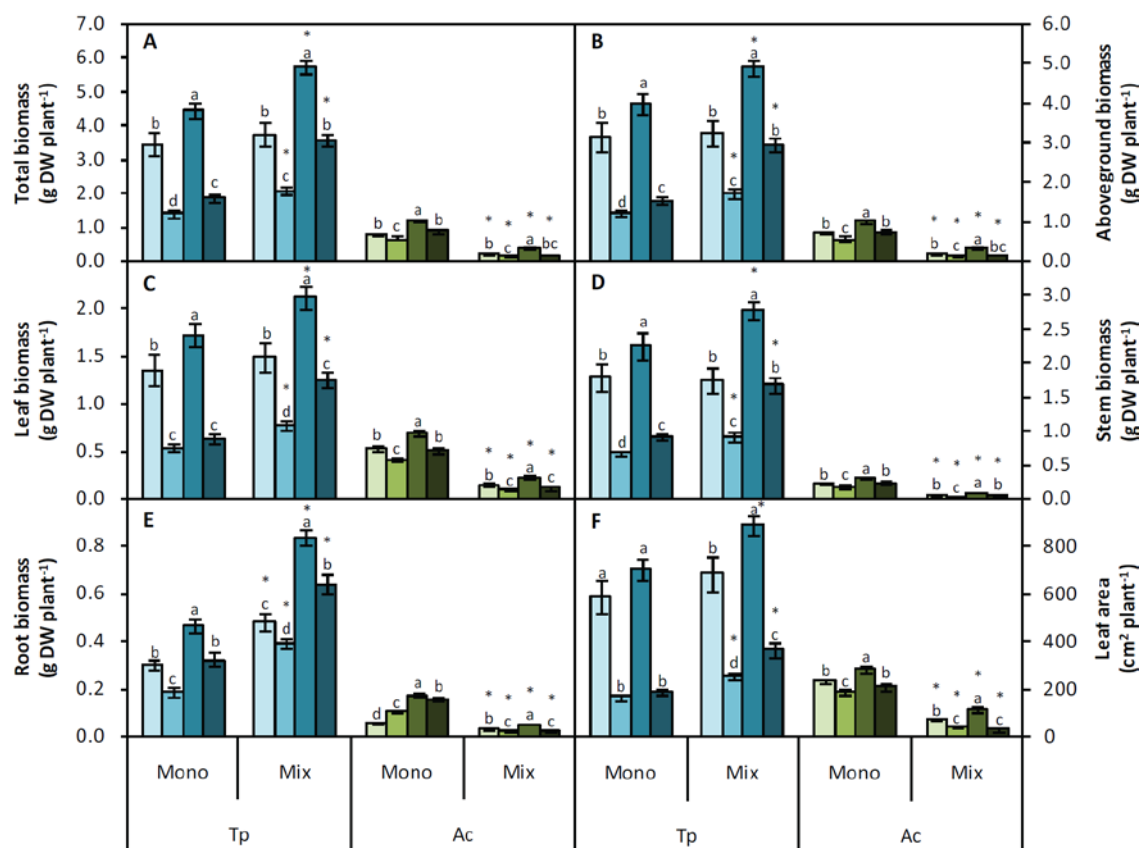


Fig. 7.2. Effects of drought, CO₂, and competition in the 16th day on total biomass (A), aboveground biomass (B), leaf biomass (C), stem biomass (D), root biomass (E), and leaf area (F). Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 7.1.

La biomasa radical de Tp presentó valores 5 veces superiores que la de Ac bajo CO₂ ambiental y buen aporte hídrico en monocultivo (Fig. 7.2E). En mezcla, las diferencias fueron superiores, alrededor de 16 veces. En condiciones de buen aporte

hídrico, la competencia incrementó la biomasa radical de Tp un 59% bajo CO₂ ambiental, mientras que a elevado CO₂ aumentó un 80%. En cambio, en Ac, la respuesta al crecimiento con Tp fue la opuesta, descendiendo un 48% bajo CO₂ ambiental y un 70% bajo CO₂ elevado.

Comparando los distintos órganos de la planta, la biomasa radical fue el órgano más afectado por el aumento de la concentración de CO₂, incrementándose un 53% y un 74% en Tp en monocultivo y en mezcla, respectivamente, y un 197% y un 74% en el monocultivo y en la mezcla de Ac, respectivamente. La sequía disminuyó la biomasa radical de Tp un 38% en monocultivo bajo CO₂ ambiental y un 30% bajo CO₂ elevado, y en mezcla un 20%, independientemente de la concentración de CO₂. En el caso de Ac, bajo CO₂ ambiental, la sequía provocó un incremento de la biomasa radical del 75% en monocultivo, mientras que en mezcla la redujo un 20%. En condiciones combinadas, bajo ambos tipos de competencia, la biomasa radical de Ac descendió, un 10% en monocultivo y un 53% en mezcla.

Tal y como ocurría en el periodo de sequía de 9 días, tras 16 días de sequía, el área foliar de Tp fue superior que la de Ac, siendo 2,5 veces en monocultivo, independientemente de la concentración de CO₂, y 8 veces en mezcla a CO₂ ambiental y 7 veces a CO₂ elevado (Fig. 7.2F). El efecto de la competencia a CO₂ ambiental tras 16 días de crecimiento sólo fue significativo en Ac, donde, en mezcla, el área foliar se redujo un 67% a CO₂ ambiental. El elevado CO₂ *per se* aumentó el área foliar en condiciones de buen aporte hídrico en todos los tratamientos (aunque en el monocultivo de Tp no fue significativo), un 30% en Tp en mezcla y en Ac un 22% en monocultivo y un 56% en mezcla. La sequía redujo el área foliar de Tp un 70% en monocultivo y un 60% en mezcla, independientemente de la concentración de CO₂. En Ac, los descensos fueron independientes de la concentración de CO₂ en monocultivo, un 26%, mientras que en mezcla fueron dependientes, un 47% a CO₂ ambiental y un 70% a CO₂ elevado.

Estas variaciones en el crecimiento de cada órgano se tradujeron en cambios en la contribución relativa de cada uno de ellos (Tabla 7.3). Tal y como ocurrió en el día 9, en el día 16, Ac presentó mayor proporción de hojas que Tp, un 65% frente a un 39%, y Tp mostró mayor proporción de tallos que Ac, alrededor del 50% frente al 25%,

respectivamente. En la contribución de las raíces las diferencias entre especies fueron dependientes tanto de los factores abióticos como de los bióticos. El tipo de competencia afectó a la contribución de los órganos en condiciones de buen aporte hídrico, observándose un descenso en la contribución caulinar en mezcla tanto de Tp (10%) como de Ac (17%). La contribución radical también se vio afectada por el tipo de competencia, aumentando su contribución en ambas especies en mezcla, un 44% en Tp y un 85% en Ac.

Table 7.3. Effects of drought, CO₂, and competition on leaf contribution (LC; %), stem contribution (SC; %), and root contribution (RC; %) in the 16th day. Statistical analysis, as depicted in Table 7.1.

| | | Tp | | | | Ac | | | |
|-----|---------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------|
| | | 400 μmol mol ⁻¹ | | 700 μmol mol ⁻¹ | | 400 μmol mol ⁻¹ | | 700 μmol mol ⁻¹ | |
| | | WW | D | WW | D | WW | D | WW | D |
| LC | Mono | 38.9 ±1.1 ^a | 38.0 ±1.4 ^a | 38.9 ±1.4 ^a | 33.5 ±1.4 ^b | 65.1 ±1.4 ^a | 58.2 ±1.5 ^b | 58.6 ±1.4 ^b | 55.3 ±0.8 ^b |
| (%) | Mixture | 39.8 ±1.3 ^a | 37.1 ±0.9 ^{ab} | 36.9 ±1.1 ^{ab} | 34.9 ±1.2 ^b | 63.6 ±1.7 ^a | 59.8 ±1.3 ^{ab} | 59.5 ±1.8 ^{ab} | 55.4 ±1.8 ^b |
| SC | Mono | 51.7 ±1.1 ^a | 48.6 ±1.4 ^a | 50.3 ±2.0 ^a | 48.9 ±1.1 ^a | 27.4 ±1.3 ^a | 24.3 ±1.7 ^a | 26.5 ±1.0 ^a | 27.1 ±0.6 ^a |
| (%) | Mixture | 46.8 ±1.3 ^{a*} | 43.5 ±1.2 ^{b*} | 48.5 ±1.2 ^a | 46.6 ±1.1 ^a | 22.5 ±1.0 ^{c*} | 25.0 ±1.3 ^{bc} | 26.3 ±1.4 ^b | 30.4 ±1.1 ^a |
| RC | Mono | 9.4 ±1.3 ^c | 13.4 ±0.8 ^b | 10.8 ±1.2 ^c | 17.5 ±1.5 ^a | 7.5 ±0.6 ^c | 17.5 ±1.7 ^a | 14.9 ±0.9 ^b | 17.6 ±0.8 ^a |
| (%) | Mixture | 13.5 ±1.3 ^{b*} | 19.4 ±1.6 ^{a*} | 14.7 ±0.6 ^{b*} | 18.5 ±1.7 ^a | 13.9 ±1.4 ^{a*} | 15.2 ±0.8 ^a | 14.3 ±1.3 ^a | 14.2 ±1.7 ^a |

El elevado CO₂ no modificó significativamente la contribución relativa de los órganos de Tp, pero sí en el caso de Ac. El elevado CO₂ provocó que la contribución foliar disminuyera un 10% en monocultivo, que la contribución caulinar aumentara un 17% en mezcla y que la contribución de las raíces se incrementara en mezcla un 100%. La sequía a CO₂ ambiental disminuyó un 10% la contribución foliar de Ac en monocultivo, pero no a CO₂ elevado. La sequía también afectó a la contribución de los tallos, donde la disminuyó un 7% en Tp en mezcla a CO₂ ambiental y la aumentó en Ac en mezcla un 11% a CO₂ ambiental y un 16% a CO₂ elevado. Las raíces fueron el órgano más afectado por la sequía y, por lo tanto, fue su contribución la que más varió. En Tp aumentó un 43% a CO₂ ambiental, cualquiera que fuera el tipo de competencia, mientras que a CO₂ elevado el incremento fue dependiente del tipo de competencia, un

62% en monocultivo y un 26% en mezcla. En Ac sólo se registraron diferencias en monocultivo, observándose un aumento del 134% a CO₂ ambiental y del 18% a CO₂ elevado.

El día 16 se observó un patrón similar en el rendimiento que en el día 9. Bajo CO₂ ambiental y buen aporte hídrico, el monocultivo de Tp presentó el mayor rendimiento, la mezcla mostró unos valores un 45% inferiores y el monocultivo de Ac, un 76% inferiores (Tabla 7.4). El elevado CO₂ aumentó el rendimiento de todos los tipos de cultivo y se siguió observando el mismo patrón entre los tipos de cultivo, aunque la diferencia entre el monocultivo de Tp y la mezcla se redujo a un 34%. La sequía disminuyó el rendimiento de todos los tipos de cultivo, a la vez que empujó las diferencias entre los mismos. A CO₂ ambiental, el rendimiento del monocultivo de Ac y de la mezcla fueron un 57% y un 24% inferiores, respectivamente, que el del monocultivo de Tp. A elevado CO₂ no se detectaron diferencias entre la mezcla y el monocultivo de Tp, mientras que el monocultivo de Ac siguió presentando el menor rendimiento, un 51% inferior.

Table 7.4. Effects of type of culture on aboveground production in the 16th day. Tp denotes *Trifolium pratense*; Ac, *Agrostis capillaris*; D, drought; WW, well-watered. Different letters along the same column indicate significant differences within each environmental condition ($P \leq 0.05$).

| | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | |
|-------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | WW | D | WW | D |
| Monoculture of Tp | 10.94 \pm 1.25 ^a | 4.22 \pm 0.26 ^a | 13.82 \pm 0.97 ^a | 5.35 \pm 0.31 ^a |
| Mixture | 5.98 \pm 0.61 ^b | 3.19 \pm 0.23 ^b | 9.07 \pm 0.41 ^b | 5.39 \pm 0.35 ^a |
| Monoculture of Ac | 2.58 \pm 0.13 ^c | 1.83 \pm 0.21 ^c | 3.52 \pm 0.13 ^c | 2.60 \pm 0.16 ^b |

7.2.3. Crecimiento relativo en sequía progresiva

Durante los primeros 14 días del experimento el RGR fue superior en Tp que en Ac, un 15% en monocultivo y un 25% en mezcla (Tabla 7.5). El tipo de competencia

sólo afectó a Tp a elevado CO₂, donde en mezcla el RGR fue un 10% superior que en monocultivo. El elevado CO₂ aumentó el RGR un 20% en el monocultivo de Tp y un 30% en Tp en mezcla, mientras que en Ac los incrementos fueron mayores, del 50% y 64% para el monocultivo y la mezcla, respectivamente.

Table 7.5. Effects of CO₂ and competition on relative growth rate (RGR; mg g⁻¹ d⁻¹), during the first 14 days of the experiment (days 0-14 after sowing). Statistical analysis, as depicted in Table 7.1

| | Tp | | Ac | |
|---------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | 400 μmol mol ⁻¹ WW | 700 μmol mol ⁻¹ WW | 400 μmol mol ⁻¹ WW | 700 μmol mol ⁻¹ WW |
| Mono | 149.3 ±4.4 ^b | 179.9 ±2.8 ^a | 129.7 ±5.4 ^b | 195.6 ±6.8 ^a |
| Mixture | 151.9 ±6.7 ^b | 198.8 ±3.2 ^{a*} | 121.3 ±8.8 ^b | 199.3 ±2.9 ^a |

Durante el primer periodo de sequía, la tasa de crecimiento relativo (RGR) se vio influida por la concentración de CO₂, el régimen hídrico, la competencia y la especie (Tabla 7.11). Así, Ac presentó un RGR un 43% superior que Tp en monocultivo a CO₂ ambiental en condiciones de buen aporte hídrico. Sin embargo, en mezcla, fue Tp la especie que mostró un RGR mayor, concretamente un 61% más alto (Fig. 7.3A). En condiciones de buen aporte hídrico y bajo CO₂ ambiental, la competencia tuvo efectos opuestos en función de la especie, concretamente, Tp vio incrementado su RGR en mezcla un 30%, pero en el caso de Ac se redujo un 44%. El aumento de la concentración de CO₂ en condiciones de buen aporte hídrico provocó una alteración en el RGR que fue dependiente de la especie y el tipo de competencia al que fueron sometidas las plantas, viéndose sólo afectado por el elevado CO₂ el RGR de Ac en mezcla, que aumentó un 55%. La sequía disminuyó el RGR de Tp un 30% en monocultivo y un 20% en mezcla, mientras que en Ac sólo descendió en monocultivo, un 17%. Cuando las plantas crecieron en condiciones combinadas de elevado CO₂ y sequía, el efecto perjudicial de la sequía sobre el RGR se atenuó, reduciéndose la caída

a sólo el 19% para el monocultivo de Tp y, en los casos de Tp en mezcla y Ac en monocultivo, los descensos se anularon a elevado CO₂.

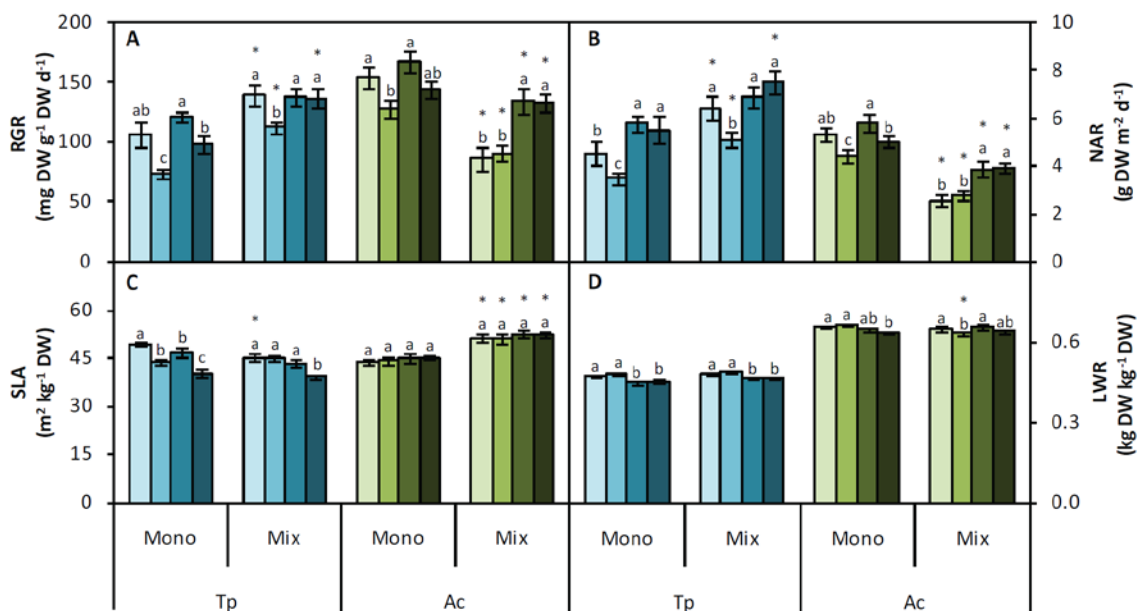


Fig. 7.3. Effects of drought, CO₂, and competition in the 9th day on relative growth rate (RGR; A), net assimilation rate (NAR; B), specific leaf area (SLA; C), and leaf weight ratio (LWR; D). Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 7.1.

La tasa de asimilación neta (NAR) también se vio influida por la concentración de CO₂, el régimen hídrico, la competencia y la especie (Tabla 7.11). De esta manera, a CO₂ ambiental en condiciones de buen aporte hídrico y en mezcla, Tp mostró un NAR 2,5 veces superior al de Ac; en cambio, en monocultivo la tendencia fue la opuesta, presentando Ac un mayor NAR, concretamente un 17% superior (Fig. 7.3B). Tal y como ocurría para el RGR, la competencia tuvo efectos opuestos en función de la especie bajo CO₂ ambiental y en condiciones de buen aporte hídrico, siendo el NAR un 40% superior en mezcla que en monocultivo en el caso de Tp, mientras que en Ac fue un 51% inferior en mezcla que en monocultivo. El incremento de la concentración de CO₂ sólo tuvo efecto significativo en el monocultivo de Tp, donde aumentó el NAR un 28% y en Ac en mezcla, donde se incrementó un 51%. La sequía bajo CO₂ ambiental provocó un descenso del NAR en Tp alrededor de un 20%, cualquiera que fuera el tipo de competencia, mientras que en Ac sólo afectó en monocultivo, donde disminuyó un

17%. En condiciones combinadas de elevado CO₂ y sequía, el efecto perjudicial de la sequía no se observó en Tp, mientras que en Ac en monocultivo se observó un descenso similar a elevado CO₂ que a CO₂ ambiental.

El área foliar específica (SLA) se vio afectada por el régimen hídrico, el tipo de competencia y la especie (Tabla 7.11). En monocultivo, Tp presentó valores un 12% superiores a Ac, mientras que en mezcla, Ac mostró un mayor SLA que Tp, un 12% (Fig. 7.3C). La competencia interespecífica redujo el SLA de Tp en condiciones de buen aporte hídrico a CO₂ ambiental un 9%, mientras que en Ac aumentó el SLA alrededor de un 16% en todos los tratamientos. El aumento de la concentración atmosférica de CO₂ redujo el SLA de Tp en monocultivo un 5% en condiciones de buen aporte hídrico, pero no afectó a Ac. La sequía redujo el SLA de Tp en monocultivo un 11% a CO₂ ambiental y un 14% a CO₂ elevado y en mezcla un 10% a CO₂ elevado, mientras que no produjo variación alguna en Ac.

La relación de masa foliar (LWR) se ha representado en la figura 7.3D, observándose unos valores aproximadamente un 30% inferiores en Tp con respecto a Ac. El tipo de competencia no afectó al LWR en condiciones de buen aporte hídrico bajo ambas concentraciones de CO₂. El aumento de la concentración de CO₂ en condiciones de buen aporte hídrico generó un descenso en el LWR en Tp del 5% en ambos tipos de competencia, pero en Ac no modificó el LWR. La sequía sólo afectó al LWR en el caso de Ac en mezcla a CO₂ ambiental, donde redujo el valor un 3%.

7.2.4. Crecimiento relativo en sequía homogénea

Durante el periodo transcurrido desde la imposición de la sequía hasta el día en que todos los cultivos alcanzaron el 15% del contenido volumétrico (día 16), el RGR de Tp fue de 112 mg g⁻¹ d⁻¹ a CO₂ ambiental y con buen aporte hídrico, mientras que el de Ac fue un 14% superior, 131 mg g⁻¹ d⁻¹. La competencia interespecífica no afectó al RGR de Tp, pero sí al de Ac, reduciéndolo un 31% a CO₂ ambiental y un 15% a CO₂

elevado (Fig. 7.4A). El aumento de la concentración de CO₂ tampoco modificó el RGR de Tp, aunque sí se observó una ligera tendencia a aumentar. Por el contrario, sí varió el de Ac, aumentándolo un 12% en monocultivo y un 38% en mezcla. La sequía, a CO₂ ambiental, redujo el RGR de Tp en ambos tipos de competencia, un 50% en monocultivo y un 30% en mezcla, mientras que en Ac, los descensos fueron menores, un 13% en monocultivo y un 23% en mezcla. A elevado CO₂, la sequía disminuyó el RGR de todos los tratamientos, aunque la magnitud del efecto varió en función de la especie y el tipo de competencia. Así, en Tp, los descensos fueron del 45% y del 23% en monocultivo y mezcla, respectivamente, y en Ac, del 12% y del 35%, respectivamente. Esto es, el efecto de la sequía fue menor a elevado CO₂ en Tp en ambos tipos de competencia, pero superior en Ac en monocultivo.

El efecto del tipo de competencia, la concentración de CO₂, el régimen hídrico y la especie en el NAR se representa en la figura 7.4B. El NAR de Tp fue un 25% superior al de Ac en monocultivo y un 110% en mezcla a CO₂ ambiental y buen aporte hídrico. La competencia aumentó el NAR de Tp un 10% a CO₂ elevado, mientras que en Ac redujo el NAR alrededor de un 35%, independientemente de la concentración de CO₂. El aumento de la concentración de CO₂ incrementó el NAR de Tp en mezcla un 23%, pero el aumento no fue significativo en monocultivo. En cambio, en Ac, el elevado CO₂ aumentó el NAR en ambos tipos de competencia, un 29% en monocultivo y un 45% en mezcla. Tras 16 días de sequía a CO₂ ambiental, el NAR de Tp disminuyó un 41% en monocultivo y un 14% en mezcla, pero en Ac no provocó ningún cambio significativo. En condiciones combinadas, el elevado CO₂ mitigó el efecto negativo de la sequía en Tp, disminuyéndolo un 32% en monocultivo y manteniéndolo constante en mezcla. Sin embargo, en Ac, la sequía a elevado CO₂ redujo el valor de NAR en monocultivo un 8%.

En monocultivo, el SLA de ambas especies fue similar bajo buen aporte hídrico en ambas concentraciones de CO₂ (Fig. 7.4C). Cuando Ac creció con Tp, su SLA aumentó un 17% cualquiera que fuera la concentración de CO₂, pero no se observaron diferencias en Tp. El elevado CO₂ en condiciones de buen aporte hídrico redujo un 6% el SLA de Tp en ambos tipos de competencia y el de Ac en monocultivo. La sequía disminuyó el SLA de Tp en monocultivo un 14% y en mezcla un 18%,

independientemente de la concentración de CO₂. En el caso de Ac, la sequía sólo influyó en mezcla, con reducciones del 13% a CO₂ ambiental y del 29% a CO₂ elevado.

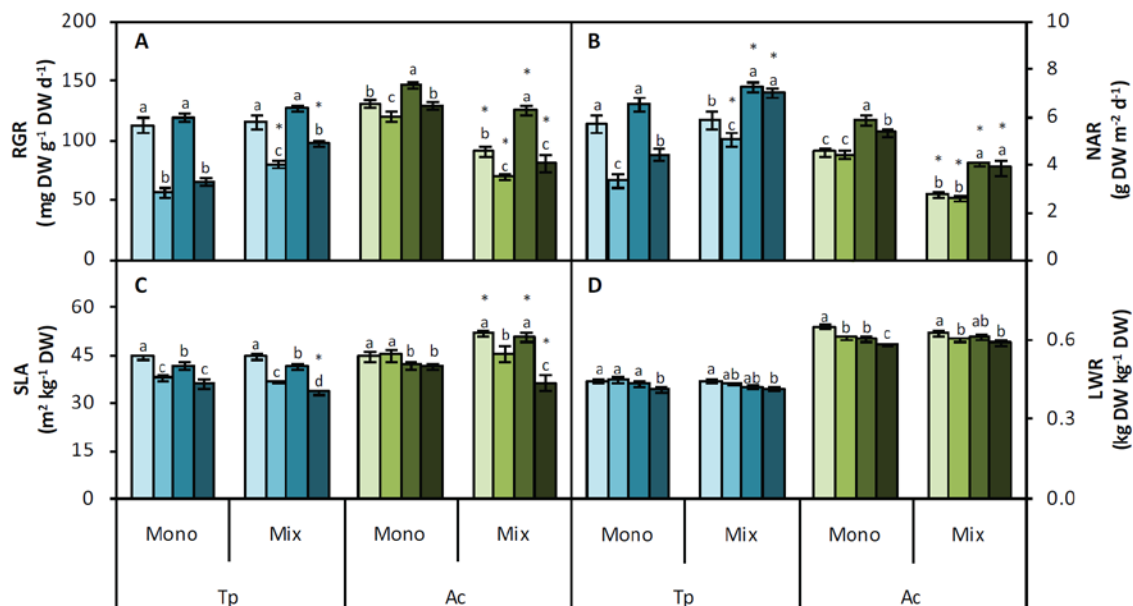


Fig. 7.4. Effects of drought, CO₂, and competition in the 16th day on relative growth rate (RGR; A), net assimilation rate (NAR; B), specific leaf area (SLA; C), and leaf weight ratio (LWR; D). Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 7.1.

Tal y como ocurrió al cabo de 9 días, en el día 16, Ac mostró unos valores de LWR superiores a los de Tp, concretamente, un 46% en monocultivo y un 29% en mezcla a CO₂ ambiental y buen aporte hídrico (Fig. 7.4D). El tipo de competencia no afectó a ninguna de las especies. El elevado CO₂ redujo el LWR de Ac en monocultivo un 8%. La sequía, a CO₂ ambiental, sólo afectó a Ac, disminuyendo el LWR tanto en monocultivo como en mezcla. A elevado CO₂, el efecto negativo de la sequía no se observó en mezcla, pero sí en los monocultivos de ambas especies.

7.2.5. Índice de competencia en sequía progresiva

La intensidad relativa de competencia (RCI) mostró valores positivos para Ac, es decir, el crecer en mezcla supuso competencia; mientras que para Tp fueron valores negativos, es decir, el crecer en mezcla supuso facilitación (Tabla 7.6). El elevado CO₂ en condiciones de buen aporte hídrico no modificó el RCI de ninguna especie. La sequía provocó valores un 22% más negativos del RCI en Tp, es decir, aumentó la diferencia entre el crecimiento en mezcla y en monocultivo ampliando la facilitación. En Ac redujo el valor del RCI un 13%, disminuyendo la magnitud de la competencia en mezcla. El elevado CO₂ no modificó el efecto de la sequía en Ac, pero sí en Tp, donde lo intensificó, descendiendo esta vez un 80%, aumentando así la facilitación.

Table 7.6. Effects of drought and CO₂ on Relative Competition Intensity (RCI) in the 9th day.

| | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | |
|----|------------------------------|---------|------------------------------|---------|
| | Well-watered | Drought | Well-watered | Drought |
| Tp | -0.36 | -0.44 | -0.35 | -0.63 |
| Ac | 0.70 | 0.61 | 0.66 | 0.60 |

7.2.6. Índice de competencia en sequía homogénea

El día 16, el RCI presentó la misma tendencia que el día 9, esto es, valores positivos para Ac y negativos para Tp (Tabla 7.7). El elevado CO₂ en condiciones de buen aporte hídrico tampoco modificó el RCI de Ac el día 16, pero sí redujo el de Tp, es decir, aumentó la facilitación que le supone a Tp el crecer en mezcla. La sequía tras 16 días provocó el mismo efecto en Tp que el día 9 a CO₂ ambiental, es decir, alcanzó valores aproximados de -0,45, mientras que a elevado CO₂ el efecto fue mayor que el día 9, registrando valores de -0,92. En Ac, la sequía tras 16 días provocó el efecto opuesto que tras 9 días, es decir, aumentó el valor del RCI un 4% a CO₂ ambiental y un 14% a CO₂ elevado; por lo tanto, aumentó la competencia.

Table 7.7. Effects of drought and CO₂ on Relative Competition Intensity (RCI) in the 16th day.

| | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | |
|----|------------------------------|---------|------------------------------|---------|
| | Well-watered | Drought | Well-watered | Drought |
| Tp | -0.08 | -0.49 | -0.29 | -0.92 |
| Ac | 0.71 | 0.74 | 0.68 | 0.78 |

7.2.7. Tasas de toma de nutrientes en sequía progresiva

El tipo de competencia afectó a las tasas de toma de los macronutrientes, aumentando en el caso de Tp en mezcla entre un 50% y un 60% y disminuyendo en Ac en mezcla un 50-60% (Tabla 7.8). El elevado CO₂, en general, no afectó a las tasas de toma en los monocultivos de ambas especies, pero sí en mezcla, donde redujo las tasas de toma de Tp un 20% aproximadamente e incrementó las de Ac entre un 80% y un 110%. La sequía provocó unas menores tasas de toma en ambas especies, alrededor de un 40% en Tp, independientemente del tipo de competencia y la concentración de CO₂, y de un 20-30% en Ac en monocultivo, cualquiera que fuera la concentración de CO₂, y, en mezcla, sólo a elevado CO₂, donde se redujeron las tasas de toma de los macronutrientes un 40%.

Table 7.8. Effects of drought, CO₂, and competition on nitrogen uptake rate (NUR), calcium uptake rate (CaUR), potassium uptake rate (KUR), magnesium uptake rate (MgUR), and phosphorus uptake rate (PUR) in the 9th day.

| | Tp | | | | Ac | | | |
|---|------------------------------|-------|------------------------------|-------|------------------------------|-------|------------------------------|-------|
| | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | | 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ | |
| | WW | D | WW | D | WW | D | WW | D |
| NUR (mg N g ⁻¹ Mono DW root day ⁻¹) | 46.10 | 24.58 | 43.46 | 19.78 | 85.83 | 68.97 | 77.03 | 61.02 |
| Mixture | 75.30 | 31.63 | 57.01 | 28.13 | 36.03 | 32.66 | 67.98 | 39.98 |
| CaUR (mg Ca g ⁻¹ Mono DW root day ⁻¹) | 15.24 | 9.62 | 12.52 | 9.98 | 6.28 | 5.14 | 5.30 | 3.67 |
| Mixture | 23.81 | 11.80 | 17.88 | 13.42 | 2.76 | 2.84 | 4.69 | 3.73 |
| KUR (mg K g ⁻¹ Mono DW root day ⁻¹) | 47.37 | 32.90 | 52.45 | 30.36 | 85.94 | 76.20 | 78.12 | 62.83 |
| Mixture | 79.46 | 39.76 | 58.12 | 41.18 | 44.85 | 39.22 | 82.39 | 44.69 |
| MgUR (mg Mg g ⁻¹ Mono DW root day ⁻¹) | 4.43 | 3.22 | 3.67 | 3.27 | 6.56 | 5.20 | 5.40 | 3.81 |
| Mixture | 6.40 | 3.18 | 5.90 | 4.11 | 2.29 | 2.66 | 5.32 | 3.40 |
| PUR (mg P g ⁻¹ DW Mono root day ⁻¹) | 7.51 | 4.12 | 7.82 | 4.66 | 15.05 | 11.08 | 14.18 | 10.09 |
| Mixture | 11.89 | 4.90 | 9.18 | 5.24 | 5.62 | 5.15 | 11.88 | 6.76 |

7.2.8. Tasas de toma de nutrientes en sequía homogénea

En el día 16, el tipo de competencia sólo afectó a las tasas de toma de los macronutrientes en Ac, disminuyéndolas en mezcla un 60% aproximadamente (Tabla 7.9). El elevado CO₂, en general, redujo las tasas de toma en ambas especies un 30%, excepto en Ac en mezcla, donde las tasas de toma de macronutrientes fueron superiores a CO₂ elevado que a CO₂ ambiental, entre un 30% y un 50%. En el periodo de sequía homogénea, los efectos que la sequía provocó en las tasas de toma de los macronutrientes fueron más severos en ambas especies y bajo ambos tipos de competencia, un 70% en Tp en monocultivo independientemente de la concentración de CO₂, un 60% en Tp en mezcla a CO₂ ambiental y un 40-45% a CO₂ elevado y en el caso de Ac, alrededor de un 60% en monocultivo a CO₂ ambiental y un 40% a CO₂ elevado, mientras que en mezcla los descensos por la sequía fueron del 40% independientemente de la concentración de CO₂.

Table 7.9. Effects of drought, CO₂, and competition on nitrogen uptake rate (NUR), calcium uptake rate (CaUR), potassium uptake rate (KUR), magnesium uptake rate (MgUR), and phosphorus uptake rate (PUR) in the 16th day.

| | Tp | | | | Ac | | | |
|---|----------------------------|-------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|
| | 400 μmol mol ⁻¹ | | 700 μmol mol ⁻¹ | | 400 μmol mol ⁻¹ | | 700 μmol mol ⁻¹ | |
| | WW | D | WW | D | WW | D | WW | D |
| NUR (mg N g ⁻¹ Mono DW root day ⁻¹) | 51.25 | 11.28 | 37.23 | 8.14 | 83.01 | 34.16 | 51.89 | 30.65 |
| Mixture | 39.63 | 14.21 | 29.34 | 15.55 | 29.06 | 15.73 | 37.36 | 20.20 |
| CaUR (mg Ca g ⁻¹ Mono DW root day ⁻¹) | 14.57 | 4.66 | 13.99 | 5.33 | 5.41 | 2.82 | 3.89 | 2.94 |
| Mixture | 11.11 | 5.15 | 11.20 | 7.10 | 2.30 | 1.59 | 2.95 | 1.80 |
| KUR (mg K g ⁻¹ Mono DW root day ⁻¹) | 57.81 | 17.31 | 42.52 | 14.64 | 79.67 | 33.63 | 49.15 | 31.42 |
| Mixture | 45.61 | 18.86 | 39.07 | 20.40 | 30.32 | 19.20 | 42.78 | 22.29 |
| MgUR (mg Mg g ⁻¹ Mono DW root day ⁻¹) | 4.42 | 1.83 | 4.41 | 1.77 | 6.00 | 2.57 | 4.44 | 2.69 |
| Mixture | 3.48 | 1.65 | 4.12 | 2.75 | 2.23 | 1.16 | 3.09 | 1.83 |
| PUR (mg P g ⁻¹ DW Mono root day ⁻¹) | 8.07 | 1.94 | 6.36 | 1.84 | 13.89 | 4.95 | 7.63 | 4.95 |
| Mixture | 6.47 | 2.35 | 5.43 | 3.06 | 4.56 | 2.53 | 6.86 | 3.69 |

7.2.9. Calidad forrajera en sequía progresiva

La relación C/N fue similar entre especies en condiciones de buen aporte hídrico (Fig. 7.5A). La especie Ac no vio afectada su relación C/N en ninguno de los tratamientos analizados, mientras que en Tp la relación C/N sólo varió en sequía a elevado CO₂, donde aumentó un 23% con respecto a las plantas crecidas a elevado CO₂ y buen aporte hídrico, independientemente del tipo de competencia.

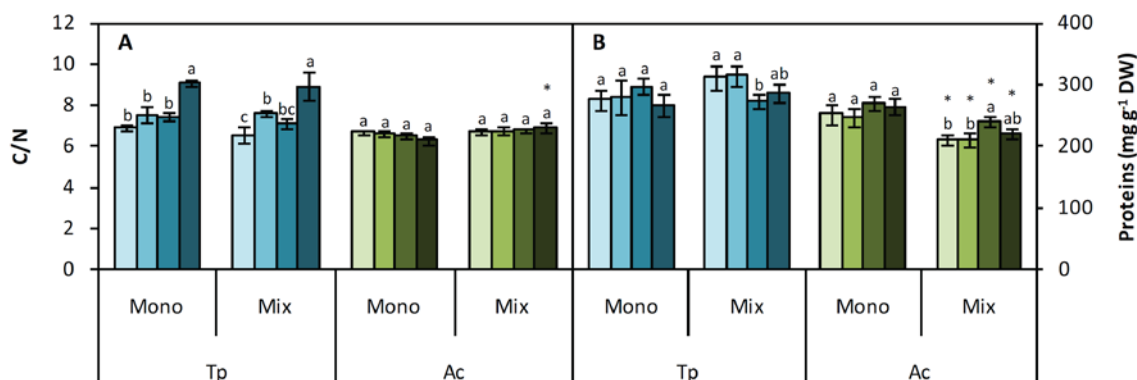


Fig. 7.5. Effects of drought, CO₂, and competition in the 9th day on C/N ratio (A) and total protein concentration (B). Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 7.1.

La concentración de proteínas totales fue, en general, superior en Tp que en Ac, alrededor de un 10% en monocultivo y un 50% en mezcla a CO₂ ambiental (Fig. 7.5B). El tipo de competencia afectó a la concentración de proteínas de manera opuesta en función de la especie, aumentando la concentración de proteínas en Tp en mezcla un 11% a CO₂ ambiental, y reduciendo la de Ac en mezcla un 17% a CO₂ ambiental y un 11% a CO₂ elevado. El aumento de la concentración externa de CO₂ sólo afectó a las plantas cuando crecieron en mezcla, por un lado, redujo la concentración de proteínas de Tp un 12% y, por otro lado, incrementó la concentración en Ac un 15%. En el periodo de sequía progresiva, la sequía no modificó la concentración de proteínas en ningún tratamiento.

7.2.10. Calidad forrajera en sequía homogénea

En el día 16 sí se observaron diferencias entre las especies, registrándose una mayor relación C/N en Tp que en Ac (Fig. 7.6A). El tipo de competencia en condiciones de buen aporte hídrico no modificó dicho parámetro en ninguna de las especies. El elevado CO₂ incrementó la relación C/N de Tp un 24% en monocultivo y un 19% en mezcla, mientras que en Ac no se observaron diferencias significativas provocadas por la concentración externa de CO₂. La sequía aumentó la relación C/N de Tp un 26% a CO₂ ambiental, independientemente del tipo de competencia, mientras que a elevado CO₂ las diferencias fueron menores, del 21% en monocultivo y del 15% en mezcla. En Ac, la sequía sólo afectó cuando se dio conjuntamente con el elevado CO₂, aumentando la relación un 28% en monocultivo y un 13% en mezcla.

El día 16 la concentración de proteínas totales también fue superior en Tp, de nuevo de manera más marcada en mezcla (Fig. 7.6B). El tipo de competencia no afectó a Tp, pero sí a Ac, donde se redujo la concentración de proteínas en mezcla un 25% a CO₂ ambiental y un 16% a CO₂ elevado en condiciones de buen aporte hídrico. El elevado CO₂ disminuyó la concentración de proteínas en Tp un 30% en ambos tipos de competencia en condiciones de buen aporte hídrico, pero no afectó a Ac. A CO₂

ambiental, la sequía redujo la concentración de proteínas de Tp un 37% en ambos tipos de competencia y, en el caso de Ac, un 24% en monocultivo y un 31% en mezcla. A CO₂ elevado, la sequía, en general, afectó en menor medida. Así, en el monocultivo de Tp no se observó descenso de la concentración de proteínas, pero sí en mezcla, donde cayó un 20%. En Ac, la disminución de la concentración de proteínas también estuvo influida por el tipo de competencia, un 14% en monocultivo y un 29% en mezcla.

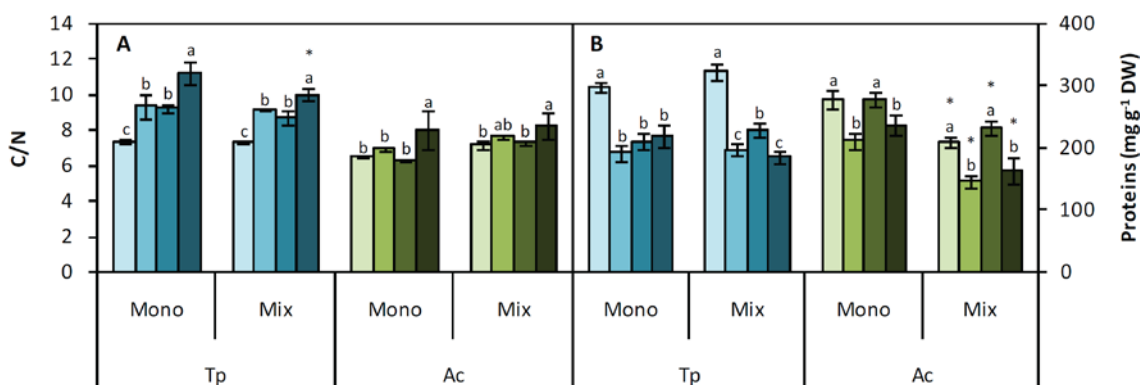


Fig. 7.6. Effects of drought, CO₂, and competition in the 16th day on C/N ratio (A) and total protein concentration (B). Growth conditions and statistical analysis, as depicted in Fig. 7.1.

La concentración de fibras, que sólo se determinó en el periodo de sequía homogénea (día 16), fue superior en Ac que en Tp (Tabla 7.10). Concretamente, Ac presentó en condiciones de buen aporte hídrico unos valores de celulosa aproximadamente un 28% mayores que Tp a CO₂ ambiental y un 66% a CO₂ elevado. En la hemicelulosa las diferencias fueron menores, del 9% a CO₂ ambiental y del 17% a elevado CO₂. En cuanto a la lignina, la concentración de CO₂ influyó en las diferencias entre especies; así, a CO₂ ambiental, Ac presentó unos valores un 42% superiores, mientras que a elevado CO₂ fue Tp la especie que registró la mayor concentración de lignina, un 53%. El efecto de la competencia sólo pudo ser analizado en Tp, ya que la drástica reducción en la biomasa en Ac cuando crecía en competencia interespecífica no permitió su determinación por no poder alcanzar el material mínimo necesario. En Tp, el tipo de competencia en condiciones de buen aporte hídrico sólo afectó a la concentración de lignina, donde la redujo un 27% en mezcla.

Cuando las plantas crecieron a elevado CO₂, el efecto del aumento de la concentración de CO₂ en las fibras fue dependiente de la especie analizada, el tipo de competencia y la fibra concreta. El elevado CO₂ redujo la concentración de celulosa en Tp en mezcla un 15%, aumentó la concentración de hemicelulosa en Ac un 16% y, en el caso de la lignina, incrementó su concentración en el monocultivo de Tp un 20% y la disminuyó en Tp en mezcla un 12% y en Ac un 45%. A CO₂ ambiental, la sequía aumentó la concentración de celulosa en Ac un 21%, mientras que la redujo en el monocultivo de Tp un 11%. La sequía también modificó la concentración de hemicelulosa, disminuyéndola en Tp un 25% en monocultivo y un 11% en mezcla, mientras que la incrementó en Ac un 11%. La lignina también se vio alterada por la sequía a CO₂ ambiental, aumentando un 55% en Tp en monocultivo y descendiendo un 32% en Ac.

En condiciones combinadas de elevado CO₂ y sequía, el efecto de la sequía se modificó. Concretamente, la concentración de celulosa aumentó un 16% en el monocultivo de Tp, así como en el monocultivo de Ac, que se incrementó un 21%. La concentración de hemicelulosa de Tp también descendió a elevado CO₂, un 27% en ambos tipos de competencia. En el monocultivo de Tp, la concentración de lignina disminuyó un 45%, mientras que tanto en Tp en mezcla como en Ac en monocultivo la lignina aumentó alrededor de un 15%.

En la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (IVDMD) sólo se detectaron diferencias significativas en Tp cuando fue sometido a sequía, donde aumentó (5% de media) independientemente de la concentración de CO₂ y el tipo de competencia (Tabla 7.10). En Ac la sequía no produjo diferencias, pero sí el elevado CO₂, que disminuyó la digestibilidad alrededor de un 5%.

Table 7.10. Effects of drought, CO₂, and competition on cellulose, hemicellulose, lignin and IVDMD in the 16th day. n.m.: not measured.

| | | Tp | | | | Ac | | | |
|-------------------|---------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|
| | | 400 μmol mol ⁻¹ | | 700 μmol mol ⁻¹ | | 400 μmol mol ⁻¹ | | 700 μmol mol ⁻¹ | |
| | | WW | D | WW | D | WW | D | WW | D |
| Celullose (%) | Mono | 11.49 | 10.24 | 10.87 | 12.64 | 14.89 | 17.98 | 17.99 | 17.61 |
| | Mixture | 12.25 | 11.63 | 10.47 | 10.21 | n.m. | n.m. | n.m. | n.m. |
| Hemicellulose (%) | Mono | 19.93 | 14.93 | 21.60 | 15.70 | 21.76 | 24.22 | 25.17 | 24.01 |
| | Mixture | 20.72 | 18.50 | 20.76 | 15.29 | n.m. | n.m. | n.m. | n.m. |
| Lignin (%) | Mono | 5.41 | 8.38 | 6.51 | 3.57 | 7.69 | 5.20 | 4.24 | 4.75 |
| | Mixture | 5.41 | 5.17 | 4.78 | 5.51 | n.m. | n.m. | n.m. | n.m. |
| IVDMD (%) | Mono | 66.22 | 70.17 | 68.28 | 71.05 | 63.84 | 63.90 | 61.13 | 61.72 |
| | Mixture | 64.46 | 67.21 | 66.89 | 72.06 | n.m. | n.m. | n.m. | n.m. |

Table 7.11. Summary of ANOVA results (*P*-values) for the effects of CO₂ (ambient and elevated), competition (comp; monoculture and mixture), water (well-watered and drought), and species (Ac and Tp) and their interactions in the 9th day. Bold values indicate significance at *P*≤0.05.

| | Total biomass | Aboveground biomass | Leaf biomass | Stem biomass | Root biomass | Leaf area | Leaf contribution | Stem contribution | Root contribution | RGR | NAR | SLA | LWR | C/N | Proteins |
|--------------------------------|---------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| CO ₂ | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.995 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.049 | 0.000 | 0.001 | 0.598 |
| Comp | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.002 | 0.013 | 0.012 | 0.840 | 0.453 | 0.603 | 0.000 | 0.466 | 0.732 | 0.221 |
| Water | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.135 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.023 | 0.001 | 0.245 | 0.000 | 0.808 |
| Sp | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.011 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| CO ₂ xComp | 0.125 | 0.140 | 0.237 | 0.102 | 0.526 | 0.671 | 0.627 | 0.045 | 0.011 | 0.173 | 0.483 | 0.817 | 0.017 | 0.680 | 0.398 |
| CO ₂ xWater | 0.166 | 0.336 | 0.261 | 0.475 | 0.000 | 0.983 | 0.508 | 0.162 | 0.033 | 0.311 | 0.076 | 0.248 | 0.386 | 0.099 | 0.949 |
| CO ₂ xSp | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.136 | 0.298 | 0.070 | 0.003 | 0.082 | 0.082 | 0.000 | 0.009 | 0.000 | 0.007 |
| CompxWater | 0.194 | 0.393 | 0.201 | 0.666 | 0.000 | 0.033 | 0.301 | 0.672 | 0.118 | 0.015 | 0.079 | 0.116 | 0.265 | 0.334 | 0.541 |
| CompxSp | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.051 | 0.289 | 0.282 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.010 | 0.076 | 0.001 |
| WaterxSp | 0.006 | 0.001 | 0.047 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.094 | 0.000 | 0.039 | 0.222 | 0.673 | 0.001 | 0.049 | 0.000 | 0.279 |
| CO ₂ xCompxWater | 0.294 | 0.491 | 0.393 | 0.648 | 0.002 | 0.805 | 0.726 | 0.377 | 0.609 | 0.857 | 0.545 | 0.552 | 0.824 | 0.952 | 0.678 |
| CO ₂ xCompxSp | 0.026 | 0.048 | 0.046 | 0.060 | 0.020 | 0.190 | 0.648 | 0.575 | 0.285 | 0.022 | 0.243 | 0.637 | 0.125 | 0.401 | 0.308 |
| CO ₂ xWaterxSp | 0.136 | 0.247 | 0.138 | 0.417 | 0.003 | 0.793 | 0.687 | 0.645 | 0.363 | 0.249 | 0.072 | 0.288 | 0.676 | 0.076 | 0.591 |
| CompxWaterxSp | 0.783 | 0.926 | 0.916 | 0.913 | 0.002 | 0.409 | 0.298 | 0.521 | 0.620 | 0.485 | 0.379 | 0.078 | 0.395 | 0.910 | 0.320 |
| CO ₂ xCompxWaterxSp | 0.299 | 0.514 | 0.412 | 0.626 | 0.001 | 0.833 | 0.471 | 0.860 | 0.539 | 0.446 | 0.320 | 0.486 | 0.494 | 0.615 | 0.371 |

Table 7.12. Summary of ANOVA results (*P*-values) for the effects of CO₂ (ambient and elevated), competition (comp; monoculture and mixture), water (well-watered and drought), and species (Ac and Tp) and their interactions in the 16th day. Bold values indicate significance at *P*≤0.05.

| | Total biomass | Aboveground biomass | Leaf biomass | Stem biomass | Root biomass | Leaf area | Leaf contribution | Stem contribution | Root contribution | RGR | NAR | SLA | LWR | C/N | Proteins |
|------------------------------------|---------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| CO ₂ | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.005 | 0.020 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.032 |
| Comp | 0.024 | 0.261 | 0.725 | 0.028 | 0.000 | 0.427 | 0.948 | 0.004 | 0.006 | 0.000 | 0.181 | 0.295 | 0.331 | 0.742 | 0.000 |
| Water | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.290 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Sp | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.694 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.139 |
| CO ₂ xComp | 0.012 | 0.025 | 0.156 | 0.009 | 0.068 | 0.253 | 0.935 | 0.013 | 0.013 | 0.115 | 0.172 | 0.351 | 0.225 | 0.357 | 0.740 |
| CO ₂ xWater | 0.040 | 0.088 | 0.076 | 0.152 | 0.017 | 0.040 | 0.955 | 0.101 | 0.126 | 0.376 | 0.476 | 0.137 | 0.968 | 0.464 | 0.000 |
| CO ₂ xSp | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.009 | 0.137 | 0.163 | 0.849 | 0.057 | 0.832 | 0.252 | 0.599 | 0.022 | 0.000 |
| Comp x Water | 0.095 | 0.070 | 0.087 | 0.095 | 0.288 | 0.985 | 0.466 | 0.104 | 0.021 | 0.408 | 0.000 | 0.000 | 0.534 | 0.350 | 0.045 |
| Comp x Sp | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.747 | 0.013 | 0.007 | 0.000 | 0.000 | 0.011 | 0.643 | 0.011 | 0.000 |
| Water x Sp | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.190 | 0.009 | 0.237 | 0.000 | 0.000 | 0.231 | 0.044 | 0.049 | 0.808 |
| CO ₂ xComp x Water | 0.991 | 0.943 | 0.732 | 0.871 | 0.671 | 0.762 | 0.801 | 0.647 | 0.855 | 0.296 | 0.640 | 0.184 | 0.725 | 0.415 | 0.118 |
| CO ₂ xComp x Sp | 0.000 | 0.001 | 0.005 | 0.001 | 0.000 | 0.040 | 0.791 | 0.794 | 0.598 | 0.893 | 0.182 | 0.673 | 0.229 | 0.432 | 0.383 |
| CO ₂ xWater x Sp | 0.186 | 0.215 | 0.284 | 0.220 | 0.592 | 0.293 | 0.208 | 0.659 | 0.085 | 0.082 | 0.383 | 0.116 | 0.154 | 0.178 | 0.001 |
| Comp x Water x Sp | 0.306 | 0.330 | 0.618 | 0.212 | 0.760 | 0.763 | 0.875 | 0.070 | 0.055 | 0.000 | 0.005 | 0.004 | 0.554 | 0.994 | 0.201 |
| CO ₂ xComp x Water x Sp | 0.973 | 0.823 | 0.610 | 0.965 | 0.188 | 0.728 | 0.111 | 0.735 | 0.049 | 0.120 | 0.815 | 0.334 | 0.120 | 0.856 | 0.843 |

7.3. Discusión

7.3.1. Efecto de la competencia en condiciones ambientales

Cuando las plantas crecieron en mezcla se observó un incremento en la biomasa en Tp y un descenso en Ac (Figs. 7.1 y 7.2). Resultados similares en el efecto de la competencia entre leguminosas y gramíneas en el crecimiento fueron obtenidos por otros autores (Zhang et al., 2008; 2009). Estos investigadores afirmaron que la razón de esto se debía a rasgos morfológicos y fisiológicos diferentes entre las especies, si bien no llegaron a dirimir las causas. Por otro lado, Reekie & Bazzaz (1989), en un estudio con plantas tropicales, afirmaron que la habilidad competitiva de las plantas depende del estadio de crecimiento. Así, en las etapas iniciales dicha habilidad reside en la proporción de biomasa destinada a las raíces para la competencia por los nutrientes, mientras que, a medida que la biomasa aérea aumenta, empieza a cobrar mayor importancia la competencia por la luz; por lo tanto, la habilidad competitiva en este estadio de crecimiento está relacionada con la altura de la canopia y la proporción de biomasa destinada a los tallos.

En este estudio, la variación de la biomasa en ambas especies fue reflejo de los cambios en el RGR, que a su vez estuvieron determinados, principalmente, por el NAR. Según los resultados, en mezcla, la mayor área foliar (Figs. 7.1F y 7.2F) y la mayor altura observada de las plantas de Tp en comparación con Ac le permitirían a Tp captar una mayor cantidad de luz con respecto a la que captaría en monocultivo, por lo que se esperaría una mayor tasa fotosintética por planta entera. En efecto, el NAR fue un 40% mayor en mezcla que en monocultivo, a pesar de tener tasas de fotosíntesis por unidad de área similares (Figs. 5.1A y 5.2A). En Ac se observó el comportamiento opuesto, disminuyendo más el NAR que la fotosíntesis, es decir, la mayor área foliar de Tp que de Ac provocaría un efecto sombreamiento en Ac, ya que el NAR es una medida de la fijación neta de CO₂ en planta entera, mientras que la tasa fotosintética es una medida instantánea en una superficie parcial y sin sombrear.

Además, la mayor biomasa radical de Tp en comparación con Ac en mezcla (por ejemplo, el día 9 a CO₂ ambiental y bajo buen aporte hídrico, la biomasa radical de Tp fue de 0,164 g DW plant⁻¹ frente a 0,012 g DW plant⁻¹ en Ac) permite una mayor exploración del suelo y aumentar la toma de agua y nutrientes (Aerts et al., 1991; Lucero et al., 1999; Acciaresi & Guamet, 2010) y así mantener un crecimiento más elevado para Tp, mientras que el efecto contrario fue observado para Ac. Sin embargo, tal y como establecieron Caldwell et al. (1985), en un experimento con fósforo marcado, la capacidad de toma de nutrientes no sólo depende de la cantidad de biomasa destinada a las raíces. Si eliminamos el efecto de la mayor biomasa radical en la toma de nutrientes a través de la tasa de toma, es decir, por unidad de biomasa radical, las tasas de toma de los macronutrientes siguen siendo superiores en mezcla que en monocultivo en Tp, alrededor de un 60%. La mayor fotosíntesis de Tp en mezcla con respecto al monocultivo podría permitir destinar una mayor proporción de la energía a las raíces para una toma más activa, como también observaron otros autores (BassiriRad et al., 1996; Pérez-López et al., 2014). En Ac se observó el caso opuesto, donde la menor fotosíntesis en mezcla con respecto al monocultivo propició un descenso en la tasa de toma del 55% en mezcla. En condiciones de buen aporte hídrico los parámetros de relaciones hídricas (Figs. 4.2 y 4.4) no estuvieron afectados por el tipo de competencia, lo que indica que la competencia subterránea fue por los nutrientes minerales y no por el agua.

Todas estas variaciones en el crecimiento se reflejan en el índice de competencia RCI (Tablas 7.6 y 7.7). El RCI muestra que, para Tp, crecer junto a plantas de Ac supone facilitación. En cambio, Ac, cuando coexiste con plantas de Tp, sufre competencia por los recursos y ve mermado su crecimiento. Este resultado también fue observado en mezcla de leguminosas y gramíneas (Zhang et al., 2008; 2009).

Sin embargo, el día 16 el efecto beneficioso de la competencia con Ac desapareció en Tp, obteniéndose valores de RCI cercanos a 0, es decir, ni facilitación ni competencia (Tabla 7.7). Esto podría deberse a la alta presión competitiva intraespecífica en mezcla que ejercían las plantas de Tp. Analizando los valores de área foliar, si se contabilizan todas las plantas en mezcla los valores obtenidos el día 16 eran similares a los obtenidos en el monocultivo de Tp el día 9, proviniendo en el caso de la

mezcla el 90% del área foliar total de plantas de Tp. Este incremento del área foliar en mezcla aumentaría la competencia intraespecífica por la luz (efecto sombreado), disminuyendo el efecto beneficioso sobre el crecimiento de Tp, como se observó al no detectarse diferencias en el NAR entre plantas de Tp crecidas en monocultivo y en mezcla el día 16. En último término, esto provocó que no hubiera diferencias en el RGR (Fig. 7.4A).

Además, las tasas de toma de macronutrientes no presentaron diferencias entre monocultivo y mezcla el día 16 (Tabla 7.9), pudiendo este hecho estar ligado a la explicación anterior, es decir, que la asimilación fotosintética a nivel de planta no fuera superior por lo que la planta no tuviera más fotoasimilados disponibles para aumentar la toma de nutrientes. Además, las plantas en mezcla presentaban una raíz más engrosada, que es menos activa en la toma de nutrientes, por lo que por unidad de biomasa radical la toma sería menor.

Los efectos de la competencia sobre el crecimiento de las plantas se tradujeron en cambios en el rendimiento (Tablas 7.2 y 7.4). A pesar del mayor crecimiento individual de las plantas de Tp en mezcla, su menor número y su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de Ac provocaron que el rendimiento de la mezcla fuera inferior al del monocultivo de Tp, aunque mayor que el del monocultivo de Ac.

El tipo de competencia también afectó a la calidad forrajera de Ac. Cuando Ac creció en mezcla se observó un descenso en la concentración de proteínas totales (Figs. 7.5B y 7.6B) que provocaron una menor calidad forrajera. La caída podría estar causada por la menor toma de nitrógeno (Tablas 7.8 y 7.9) y, por tanto, por su menor disponibilidad. Hu et al. (2015) también observaron una menor concentración de nitrógeno causada por una menor toma en plantas crecidas en competencia con *Hordeum jubatum* con respecto a cuando crecieron en monocultivo.

7.3.2. Efecto del CO₂ en condiciones de buen aporte hídrico

El aumento de la concentración atmosférica de CO₂ aumenta las tasas fotosintéticas (Figs. 5.1A y 5.2A). Esto permite una mayor disponibilidad de azúcares, lo que posibilita un incremento en la acumulación de biomasa en las plantas (Figs. 7.1 y 7.2). Esta respuesta ha sido observada en la mayoría de las especies vegetales (Poorter & Pérez-Soba, 2002).

El incremento de la biomasa en Tp no fue equitativo entre órganos, variando, además, en función del día analizado. Así, el día 9, la contribución de las raíces aumentó a elevado CO₂, lo que, atendiendo a la teoría de Brouwer del equilibrio funcional de distribución de los nutrientes a los órganos limitantes (Brouwer, 1962a, b; 1963), indica que los recursos minerales a elevado CO₂ eran limitantes. Esto pudo deberse a que el mayor crecimiento requirió un mayor aporte de elementos minerales y, por tanto, mayor competencia por dichos recursos, destinando la planta, de esta manera, una mayor proporción de fotoasimilados al crecimiento de las raíces para poder aumentar la toma de nutrientes. En cambio, en Ac, no hubo alteración alguna en la contribución de los órganos, lo que está más en línea con los resultados recopilados por Stulen & Den Hertog (1993). Estos hechos en su conjunto nos indicarían que en los cultivos en los que participa Tp existe competencia intraespecífica por parte de Tp por los recursos minerales, mientras que la competencia intraespecífica de Ac sería menor. Sin embargo, en el día 16 no se observó un incremento en la contribución de las raíces de Tp. Esto podría atribuirse a que se produjo un cambio en el factor limitante, pasando la luz a ser el factor limitante, fruto del aumento del área foliar (Fig. 7.2F) y de una canopia más densa. Este cambio del factor limitante en función del estadio de crecimiento también fue observado por Reekie & Bazzaz (1989).

A pesar de observarse una mayor acumulación de biomasa en ambas especies, el RGR no aumentó en Tp a elevado CO₂. Varios autores han afirmado que el efecto beneficioso del elevado CO₂ se observa en las etapas iniciales (Poorter, 1993; Pérez-López et al., 2013a), lo que concuerda con lo observado, ya que, desde la siembra al día de inicio del tratamiento de sequía, el RGR sí fue estadísticamente superior a elevado CO₂ (Tabla 7.5). Además, Poorter & Pérez-Soba (2002) observaron que la respuesta al

elevado CO₂ depende del balance entre los carbohidratos generados en la fotosíntesis y los utilizados para crecimiento o almacenados en órganos específicos. La acumulación de carbohidratos observada (Figs. 5.9 y 5.10) provocó un menor estímulo del RGR por el incremento de la concentración de CO₂, ya que son fotoasimilados que no se dedican a la producción de nueva biomasa. Esto se refleja en el SLA, que disminuyó (Figs. 7.3 y 7.4) en los casos en los que se observó mayor acumulación de azúcares, como también observó Faria (1996). En general, este descenso del SLA estuvo compensado por un incremento del NAR, debido a las mayores tasas fotosintéticas (Usuda, 2006). Esta respuesta del NAR y del SLA al elevado CO₂ ha sido observada también por otros autores (Rogers et al., 1984; Temperton et al., 2003).

Sin embargo, en algunas condiciones (Tp en mezcla el día 9 y en monocultivo el día 16), a pesar de observarse mayores tasas fotosintéticas en todos los tratamientos, el NAR se mantuvo constante. Esto indicaría que en estos tratamientos la tasa de respiración a elevado CO₂ aumenta mitigando el efecto observado en la tasa fotosintética, manteniendo el NAR constante. La mayor toma de minerales y, en general, los mayores costes del metabolismo por el incremento en el crecimiento pudieron ser las causas del aumento de la respiración, como también apuntaron (Wang et al., 2001; Leakey et al., 2009b; Pérez-López et al., 2013a).

En Ac, los incrementos en biomasa sí se debieron a un aumento del RGR (Figs. 7.3A y 7.4A). Esto podría deberse a que Ac es una especie de crecimiento más lento que Tp y, por tanto, el periodo de crecimiento en el que se observa el efecto beneficioso del elevado CO₂ en el RGR se mantiene por más tiempo. El incremento del RGR estuvo mediado por el aumento del NAR debido a las mayores tasas fotosintéticas observadas a elevado CO₂, al mismo tiempo que, debido a que se producía una menor acumulación de azúcares en esta especie, el SLA se mantuvo, en general, constante (Figs. 7.3 y 7.4).

Estos efectos del elevado CO₂ en la biomasa individual se tradujeron en un incremento en el rendimiento de todos los tipos de cultivo (Tablas 7.2 y 7.4). El elevado CO₂ no afectó a la competencia entre las plantas (Tablas 7.6 y 7.7), excepto en Tp el día 16, donde a CO₂ ambiental no hubo diferencia entre los tipos de competencia, pero sí a elevado CO₂, ocurriendo mayor facilitación para Tp en mezcla. Esto pudo deberse a una

limitación de la difusión de CO_2 a CO_2 ambiental por un alto consumo debido a la alta superficie foliar, por lo que la concentración de CO_2 era limitante e impedía que las plantas siguieran creciendo. En cambio, en condiciones de aumento de la concentración atmosférica de CO_2 , el elevado CO_2 permitiría una mayor difusión de CO_2 , eliminando este efecto sobre el crecimiento.

El aumento de la concentración atmosférica de CO_2 provocó en Tp un descenso de la concentración de proteínas totales y un aumento de la relación C/N, lo que contribuyó a un descenso de la calidad forrajera. Esta disminución podría ser consecuencia de un efecto dilución sobre el nitrógeno al no aumentar su toma y equipararla con el incremento en la acumulación de biomasa (Field et al., 1992; Gifford et al., 2000), aunque otros autores achacan la caída de la concentración de las proteínas a un descenso en las proteínas del aparato fotosintético por una inhibición en la expresión de los genes implicados en su síntesis como consecuencia de la acumulación de carbohidratos (Fangmeier et al., 1999; Moore et al., 1999). Esta disminución en la calidad fue más acusada el día 16, probablemente porque ese día se detectó una mayor acumulación de almidón (Fig. 5.10D) y porque, como se ha comentado anteriormente, el día 16 la luz se convirtió en un factor limitante para el crecimiento de Tp, y Tp asignó una mayor proporción de recursos a los órganos responsables de su toma, disminuyendo la distribución de fotoasimilados a las raíces lo que provocó que la toma de nitrógeno fuera menor. En Ac, los parámetros relacionados con el nitrógeno no se vieron afectados en ningún caso, no observándose tampoco acumulación de almidón (Fig. 5.10D). Sin embargo, en el monocultivo de Ac el día 16, en comparación con Tp, sí se observó un aumento de la concentración de carbohidratos estructurales como celulosa y hemicelulosa, que se tradujo en un descenso en la digestibilidad *in vitro* (Tabla 7.10). Además, niveles superiores de fibras reducen la capacidad de ingesta de los animales porque producen un efecto de llenado y sacia en los animales antes de que éstos hayan maximizado su aporte calórico, lo que finalmente también se traduce en una menor calidad del pasto (Van Soest, 1994).

7.3.3. Efecto de la sequía bajo CO₂ ambiental

Las plantas sometidas a sequía (Fig. 4.1) vieron afectado su estado hídrico, reduciéndose su RWC y presentando Ψ_w más negativos (Figs. 4.2 y 4.3B). En Tp, la caída del Ψ_w fue acompañada por la pérdida de turgencia (Fig. 4.3F) lo que limitó la expansión celular, al mismo tiempo, el descenso de la fotosíntesis (Figs. 5.1A y 5.2A) disminuyó la disponibilidad de fotoasimilados. Ambos factores provocaron la disminución tanto del área foliar (Figs. 7.1F y 7.2F), como de la acumulación de biomasa (Figs. 7.1A y 7.2A). Patrones similares en respuesta a la sequía han sido puestos de manifiesto ampliamente en la bibliografía (Boyer, 1968; Hsiao, 1973; Hsiao et al., 1976).

En todos los tratamientos de Tp como respuesta al déficit hídrico, aunque la biomasa radical se mantuvo o disminuyó (Figs. 7.1F y 7.2F), se incrementó su contribución porcentual a la biomasa total de la planta (Tablas 7.1 y 7.3). De esta manera, la planta aumentó la superficie de absorción de agua y elementos minerales. Esta estrategia ha sido observada también por otros autores en especies del género *Trifolium* (Lucero et al., 1999; 2000) y es considerada un mecanismo de tolerancia ante la sequía (Markesteyn & Poorter, 2009).

Estos cambios en el crecimiento absoluto fueron consecuencia de cambios en los parámetros relativos. El descenso del RGR estuvo mediado fundamentalmente por la caída del NAR, no obstante también se observaron descensos, aunque menores, del SLA (Figs. 7.3 y 7.4). La disminución del NAR se debería, por un lado, a la mencionada caída de la tasa fotosintética y, por otro lado, a que, tal y como varios estudios han afirmado, la sequía aumenta el cociente respiración/fotosíntesis (Ribas-Carbo et al., 2005; Atkin & Macherel, 2009) para activar mecanismos de tolerancia al estrés hídrico, como son el ajuste osmótico y la toma activa de elementos minerales y agua. El descenso del SLA podría, al menos parcialmente, estar relacionado con la acumulación de solutos compatibles (Tablas 4.2A y 4.4A), como se deduce de la correlación positiva entre el ajuste osmótico y el SLA, como también observaron Marron et al. (2003). Esta respuesta fue generalizada en Tp, excepto en el día 9 en mezcla, donde, aunque se observó un descenso del RGR, el SLA no descendió probablemente porque Tp no

presentó ajuste osmótico en esa etapa inicial del tratamiento de sequía, por lo que la caída del RGR estuvo mediada exclusivamente por el NAR, que disminuyó un 20% a pesar de que Tp no vio reducida su tasa fotosintética (Fig. 5.1A).

Aunque la tasa fotosintética no disminuyera significativamente, el NAR pudo verse influido por variaciones en la fotosíntesis en planta entera y/o por la respiración. El incremento en la contribución de las raíces reduce la proporción de biomasa fotosintética, con lo que se esperaría que la fotosíntesis a nivel de planta entera disminuyera. Además, para mantener la toma de agua y minerales, las raíces están más activas, por lo que respiran más. Asimismo, el mantenimiento del balance iónico celular y la osmorregulación observada (Tablas 4.1 y 4.3), así como la inducción de los sistemas antioxidantes (Capítulo 6), requieren un gasto energético elevado a través de la respiración de mantenimiento. Esto lleva a que los fotosintetizados no se acumulen y se gasten en la respiración celular, lo que, finalmente, se traduce en un menor NAR tanto por un descenso en la tasa fotosintética en planta entera como por una mayor respiración. Atkin & Macherel (2009) afirmaron, en una recopilación de estudios, que, en un 33% de los mismos, la respiración aumentaba en sequía. Además constataron que, en general, aunque la respiración disminuyera, la tasa fotosintética se reducía en un mayor porcentaje, lo que también se traduce en un menor NAR.

En el caso de Ac, el efecto de la sequía estuvo marcadamente influido por el tipo de competencia al que fueron sometidas las plantas. En monocultivo, se registraron descensos similares el día 9 y el día 16 en el crecimiento, a pesar de que la cantidad de agua disponible en el suelo fue menor el día 16 (Fig. 4.1). Esto podría deberse a que en el día 9 no se observaron diferencias entre los órganos, pero sí en el día 16 (Tabla 7.3), donde aumentó notablemente la contribución de las raíces a costa de la biomasa foliar, para, como se ha dicho anteriormente, aumentar la superficie de exploración del suelo y mantener la toma de agua para, de esta manera, contrarrestar la menor agua disponible.

El descenso en la biomasa de Ac en monocultivo fue debido a la caída del RGR. Esta disminución del RGR estuvo provocada exclusivamente por la caída del NAR (componente funcional) en el día 9; sin embargo, la tasa fotosintética no disminuyó (Fig. 5.1A), lo que indicaría que la reducción del NAR podría deberse a un aumento de

la respiración, posiblemente para activar los mecanismos de tolerancia a la sequía como también se ha comentado anteriormente para Tp. Bajo unas condiciones de sequía más severa, el efecto del NAR sobre el RGR desapareció, convirtiéndose el componente morfológico en el limitante del RGR, registrándose un descenso del LWR. Como se ha mencionado anteriormente, el aumento de la contribución de las raíces el día 16 implicó una menor proporción de biomasa asignada a las hojas, con lo que el LWR disminuyó.

Cuando Ac creció en mezcla, en el día 9, no mostró diferencias en el crecimiento, debido principalmente a que ni las relaciones hídricas ni los procesos fotosintéticos se mostraron afectados (Capítulos 4 y 5). En cambio, tras 16 días de sequía, los principales indicadores del estado hídrico y de los procesos fotosintéticos de la planta disminuyeron sus valores. Esto se tradujo en un descenso en la acumulación de biomasa y en una menor área foliar (Fig. 7.2). En contraposición a lo observado en Tp, en el que existía una distribución alométrica del crecimiento en condiciones de sequía, incrementándose la contribución de las raíces a fin de mejorar la adquisición del recurso más limitante (el agua) por el trébol a costa de las hojas, no se observó una distribución alométrica en Ac en condiciones de sequía, lo que se correspondería con la necesidad de equilibrar la obtención de los recursos limitantes que en este caso eran tanto la luz como el agua y los nutrientes, debido a la fuerte competencia tanto aérea como subterránea de Tp en los cultivos en mezcla. El descenso asociado del RGR fue propiciado por una disminución del SLA y del LWR y no del NAR. Como se ha visto para Tp, la caída del SLA parece estar relacionada con la acumulación de osmolitos para realizar ajuste osmótico. El descenso del LWR estaría provocado por la menor asignación de fotoasimilados al órgano foliar a favor del caulinar para aumentar la altura de las plantas y así, la captación de luz.

Estos cambios en el crecimiento de ambas especies ante el déficit hídrico se tradujeron en variaciones en el RCI (Tablas 7.6 y 7.7). En el caso de Tp, la sequía permitió un mayor crecimiento en mezcla que en monocultivo comparando con los mismos tratamientos bajo buen aporte hídrico en ambos días analizados, es decir, hubo mayor facilitación. Esto podría deberse a que la competencia que sufrió Tp en monocultivo (competencia intraespecífica) fue mayor que en mezcla (competencia intraespecífica e interespecífica), es decir, que aunque en mezcla la biomasa por planta

de Tp fue mayor que en monocultivo y, por tanto, su requerimiento hídrico, lo que haría aumentar la competencia intraespecífica de Tp en mezcla por el agua, el menor número de plantas (6 frente a 12) y la baja competencia interespecífica (de Ac) provocaría que finalmente la competencia en mezcla fuera menor. Esto queda evidenciado también si se analiza la biomasa radical, ya que la biomasa radical de las 12 plantas de Tp en monocultivo fue superior a la de las 6 de Tp y 6 de Ac en mezcla. En Ac, las variaciones del RCI fueron dependientes del periodo analizado, en relación con la disponibilidad de agua en el sustrato. En el día 9, gracias a la reducción de crecimiento de Tp en mezcla, Ac no sufrió tanta competencia, disminuyendo el valor de RCI (Tabla 7.6). Sin embargo, bajo condiciones de sequía edáfica más severas (día 16), la mayor biomasa radical de Tp le permitió captar la escasa agua existente, dejando a Ac sin dicho recurso, provocando un efecto más negativo sobre Ac en mezcla que en monocultivo el día 16.

Los diferentes efectos de la sequía sobre el crecimiento de cada especie en función del tipo de competencia provocaron alteraciones en el rendimiento de cada tipo de cultivo (Tablas 7.2 y 7.4). En todos ellos, la sequía redujo el rendimiento, aunque de manera más notable en el monocultivo de Tp, por lo que las diferencias entre los tipos de cultivo disminuyeron en sequía.

La sequía tuvo un marcado efecto sobre la calidad forrajera. En el periodo de sequía progresiva la concentración de proteínas totales no se vio afectada en ninguna especie, pero sí lo hizo la relación C/N, incrementándose en Tp en mezcla. Cuando la sequía fue más severa, el efecto de la sequía sobre la relación C/N fue mayor y en ambos tipos de competencia en Tp y, además, se observó un descenso en la concentración de proteínas totales en las dos especies. Estos hechos pudieron deberse a la disminución en la tasa de toma de nitrógeno observada (Tabla 7.9), causada principalmente por la reducción de la transpiración y por una menor capacidad de absorber iones por parte de las raíces (Tanguilig et al., 1987). En cuanto a las fibras, en Tp se observó una menor concentración de fibras que se tradujo en una mayor digestibilidad *in vitro* (Tabla 7.10). Peterson et al. (1992) y Sheaffer et al. (1992) también observaron un descenso en la concentración de fibras provocado por la sequía. Además, la mayor acumulación de azúcares solubles en Tp que en Ac también pudo

propiciar la mayor digestibilidad en condiciones de sequía, ya que estos compuestos son fácilmente digeribles, como también observaron en alfalfa Lechtenberg et al. (1971).

7.3.4. Efecto de la sequía bajo CO₂ elevado

El efecto de la sequía en condiciones de elevado CO₂ fue dependiente de la especie, el tipo de competencia y el periodo de sequía. Sin embargo, se observaron algunas tendencias generales. Por un lado, en todos los tratamientos, excepto en Ac cuando creció en mezcla el día 16, se registró una mayor acumulación de biomasa a elevado CO₂ que a CO₂ ambiental (Figs. 7.1 y 7.2), debido a las mayores tasas fotosintéticas registradas (Figs. 5.1A y 5.2A). Además, tal y como ocurrió a CO₂ ambiental, se observó una mayor proporción en la distribución de fotoasimilados a la raíz con respecto a plantas crecidas en condiciones de buen aporte hídrico, excepto en Ac cuando creció en mezcla. Esta excepción podría deberse a que, como se ha dicho anteriormente, la competencia de Tp tanto por la luz como por el agua y los nutrientes minerales originarían una menor disponibilidad de los recursos tanto aéreos como subterráneos para Ac, ante lo cual Ac trata de equilibrar el crecimiento entre los diferentes órganos y mantener la homeostasis de su crecimiento. Asimismo, en Tp en todos los tratamientos, excepto el día 16 en mezcla, la contribución de las raíces fue superior a CO₂ elevado que a CO₂ ambiental. El incremento en la distribución de fotoasimilados a la raíz en condiciones de sequía es considerado un rasgo de tolerancia a la sequía (Markesteijn & Poorter, 2009), por lo que el elevado CO₂ permitiría aumentar la tolerancia a la sequía de Tp. La excepción podría suceder porque en el día 16, la biomasa total de raíces en mezcla contando las dos especies fue superior a la biomasa total del monocultivo de Tp, pudiendo ello significar que en mezcla existía una saturación de raíces y, por tanto, el efecto beneficioso del elevado CO₂ sobre la proporción de raíces desapareció.

El elevado CO₂ mitigó parcialmente el efecto perjudicial de la sequía el día 9 en la acumulación de biomasa de Tp en monocultivo, como también se observó en el RGR.

Esto estuvo provocado por tres factores. Por un lado, el NAR no se vio modificado, mientras que a CO_2 ambiental se redujo. Debido a que las reducciones de las tasas fotosintéticas el día 9 por la sequía fueron similares entre concentraciones de CO_2 , cabría esperar que la diferente respuesta del NAR a la sequía en función del CO_2 fuera parcialmente debida a la respiración y/o a la fotorrespiración. Por otro lado, el SLA se redujo más que a CO_2 ambiental debido al mayor ajuste osmótico realizado a elevado CO_2 que a CO_2 ambiental en plantas de sequía y, por lo tanto, su mayor acumulación de solutos. En tercer lugar, la mayor distribución de fotoasimilados a las raíces redujo el LWR (Fig. 7.3D), es decir, la biomasa destinada a la fotosíntesis. La respuesta de los tres componentes del RGR provocó que, finalmente, el RGR disminuyera, pero en menor medida que a CO_2 ambiental.

Se observó que a medida que el periodo de sequía iba incrementándose, la magnitud del estrés hídrico fue en aumento. En el día 16, tras un periodo más largo de sequía y en unas condiciones de RSWC homogéneas (Fig. 4.1), a pesar de la mayor biomasa total registrada a elevado CO_2 con respecto a CO_2 ambiental, la biomasa foliar no siguió este mismo patrón, no observándose diferencias entre CO_2 ambiental y elevado, lo que reforzaría la idea anterior de que en condiciones de sequía para la planta es más necesario invertir en la parte subterránea para la toma de agua y nutrientes minerales que en la parte aérea para la captación de luz y CO_2 , es decir, que el extra de fotoasimilados, gracias al elevado CO_2 , la planta lo destinó a aumentar la biomasa radical para incrementar la toma de agua y nutrientes minerales. Además, en el día 16, el RGR mostró unos valores similares entre las dos concentraciones de CO_2 . Sin embargo, sí se detectaron diferencias cuando se analizaron individualmente sus componentes. Por un lado, a pesar de que la caída provocada por la sequía en el NAR fue similar que a CO_2 ambiental, los valores absolutos del NAR fueron superiores a CO_2 elevado que a CO_2 ambiental debido a las mayores tasas fotosintéticas (Fig. 5.2A). Sin embargo, por otro lado, como ocurría el día 9, el mayor ajuste osmótico y la mayor proporción de fotoasimilados distribuidos a la raíz provocaron un mayor descenso del SLA y LWR a elevado CO_2 que a CO_2 ambiental.

La respuesta de T_p en mezcla también varió en función del periodo de sequía, aunque en ambos casos la caída a elevado CO_2 fue menor que a CO_2 ambiental. En el

día 9, incluso, a elevado CO₂ no se observó un descenso en la acumulación de biomasa, mientras que sí se observó a CO₂ ambiental. No obstante, el efecto sobre el estado hídrico fue similar a ambas concentraciones de CO₂ en los dos periodos de sequía (capítulo 4), lo que indicaría que el elevado CO₂ no protegió de la sequía a través de un mejor estado hídrico, sino por una mayor fotosíntesis (De Luis et al., 1999; Perry et al., 2013). Igual que sucedía para el monocultivo de Tp, a pesar de registrarse unos descensos de las tasas fotosintéticas similares entre concentraciones de CO₂, el NAR no se vio modificado por la sequía a CO₂ elevado, pero sí a CO₂ ambiental (Figs. 7.3B y 7.4B), lo que indicaría que la respiración y/o la fotorrespiración se redujeron más a CO₂ elevado que a CO₂ ambiental. En ambos periodos de sequía, el SLA disminuyó, aunque más notablemente en el día 16, posiblemente resultado del mayor ajuste osmótico (Tabla 4.3). Estas variaciones en la respuesta a la sequía, dependiente de la concentración de CO₂, en los componentes del RGR provocaron que, en el día 9, el RGR se mantuviera constante y que, en el día 16, el RGR se redujera en sequía a elevado CO₂, pero en menor medida que a CO₂ ambiental.

La respuesta de Ac también estuvo influida por el tipo de competencia. Así, en monocultivo se apreció que los valores de biomasa obtenidos a elevado CO₂ y sequía fueron similares a los registrados a CO₂ ambiental y en condiciones de buen aporte hídrico (Figs. 7.1 y 7.2). El RGR disminuyó ambos días en proporciones similares, lo que indica que la imposición de la sequía fue progresiva y Ac pudo activar mecanismos de tolerancia para evitar un excesivo daño. En ninguno de los dos días se observaron diferencias con los tratamientos a CO₂ ambiental, a pesar de presentar mayores tasas fotosintéticas y NAR. Sin embargo, la mayor distribución de fotoasimilados a las raíces redujo el LWR (Figs. 7.3D y 7.4D), es decir, la biomasa destinada a la fotosíntesis. Y en el caso del día 16, además, la acumulación de almidón y azúcares solubles provocó un descenso del SLA, compensando, por lo tanto, estos parámetros el mayor NAR.

Cuando Ac creció en mezcla existieron diferencias en función del periodo de sequía analizado. En el día 9 en Ac en mezcla, la sequía no provocó una reducción de la acumulación de biomasa como tampoco se observó a CO₂ ambiental, debido a que el efecto de la sequía no fue notable sobre el estado hídrico (capítulo 4) y el metabolismo fotosintético (capítulo 5). Por lo tanto, el RGR tampoco se vio modificado por la sequía.

En cambio, en el día 16, el RWC descendió notablemente (Fig. 4.4) como también lo hizo la tasa fotosintética (Fig. 5.2A). Estos cambios provocaron un descenso en el crecimiento (Fig. 7.2). El descenso del RGR no estuvo provocado por el NAR, que se mantuvo constante, lo que indicaría que Ac reguló también la respiración debido al menor requerimiento de energía para el crecimiento. En cambio, el SLA disminuyó notablemente debido a la acumulación de solutos para ajuste osmótico como la prolina, entre otros (Fig. 4.4B).

Estas variaciones en la respuesta individual de las plantas a la sequía a CO₂ elevado con respecto a CO₂ ambiental se tradujeron en que el rendimiento del monocultivo de Tp y de la mezcla no presentaran diferencias (Tablas 7.2 y 7.4), ya que se compensó el mayor número de plantas de Tp en monocultivo con el mayor crecimiento de cada planta de Tp en mezcla junto con el crecimiento de Ac en mezcla. Además, estos cambios también provocaron que el día 9 la facilitación para Tp aumentara con respecto a las plantas en sequía crecidas a CO₂ ambiental, ya que la sequía a elevado CO₂ afectó al crecimiento en monocultivo, pero no en mezcla. En el día 16, a pesar de que la sequía afectó al crecimiento de las plantas de Tp en mezcla, el efecto fue inferior al de las plantas en monocultivo, por lo que el RCI disminuyó, es decir, hubo una mayor facilitación. En Ac no hubo diferencias en el crecimiento en el día 9 entre concentraciones de CO₂, por lo que el RCI no se vio modificado, en cambio, en el día 16, el crecimiento de Ac en mezcla se redujo en mayor porcentaje a elevado CO₂ debido a la mayor presión competitiva de Tp, lo que resultó en un RCI más alto y, por tanto, en una mayor competencia.

La relación C/N aumentó más que a CO₂ ambiental, ya que hubo un efecto aditivo del elevado CO₂ y de la sequía. En el día 9, sólo se observó efecto en Tp en ambos tipos de competencia, ya que el efecto de la sequía sobre las tasas de toma de los nutrientes minerales fue superior en Tp que en Ac. En cambio, no se observaron diferencias en la concentración de proteínas totales, lo que indicaría que fueron otros compuestos nitrogenados los que se vieron afectados por la reducción en la toma y, por tanto, se podría decir que, al menos a CO₂ elevado, la planta tiende a mantener el nitrógeno en las proteínas por encima de otros compuestos nitrogenados.

En el día 16, en un nivel de sequía homogéneo entre tratamientos, el efecto de la sequía se observó en todos los tratamientos, de nuevo, de manera aditiva al elevado CO₂ en el caso de Tp y de forma sinérgica en Ac. En ambos casos, este aumento en la relación C/N estuvo acompañado por un descenso en la concentración de proteínas.

Igual que ocurrió a CO₂ ambiental, en Ac no varió la concentración de fibras, pero sí lo hizo en Tp en ambos tipos de competencia, donde disminuyó la concentración de hemicelulosa, lo que se tradujo en una mayor digestibilidad *in vitro* (Tabla 7.10) aumentando la calidad forrajera. Además, como se ha comentado anteriormente, la menor concentración de fibras permitiría una mayor ingesta diaria de los animales debido a que producen un efecto de llenado y sacia en los animales antes de que éstos hayan maximizado su aporte calórico, lo que finalmente también se traduce en una menor calidad del pasto (Van Soest, 1994).

7.4. Conclusions

- The development in mixture benefited Tp through an increase light and mineral nutrients uptake, while in Ac the opposite effect was observed.
- The interspecific competition caused a decline in the forage quality of Ac due to a lower total protein concentration induced by the lower nutrient uptake in mixture with respect to monoculture.
- The elevated CO₂ favored growth of all treatments due to higher photosynthetic rates.
- The elevated CO₂ decreased the forage quality of Tp through an increase in the C/N ratio caused by sugar accumulation.
- Drought reduced growth in both species due to lower photosynthetic rates and a loss of turgor.
- Plants in drought increased the proportion of roots to increase water and mineral nutrients uptake.
- The forage quality of the plants in drought conditions decreased due to a lower concentration of proteins. In Tp, the effect of drought was partially mitigated by the lower concentration of fibers, which increased digestibility.
- The elevated CO₂ protected Tp from drought through higher photosynthetic rates, but not by a better water status.

- The elevated CO₂ increased the drought tolerance of Tp due to the increase in the proportion of photoassimilates allocated to roots in order to increment the water and minerals uptake.

8. General discussion

Because of the integrative nature of chapter 3 it is not taken into account in the development of the general discussion. To confirm certain assumptions developed in that chapter, it was necessary to delve into some of the physiological processes studied in that chapter and others not analyzed. The study with four species posed a number of obstacles for this purpose, like insufficient space in the growth chamber to obtain sufficient statistical power and the lack of plant material, since the growth of *Festuca rubra* was very low and would not let making the enzyme assays and minerals and forage quality determination. Therefore, and in order to confirm the hypothesis set out in chapter 3, the two species experiment was developed.

The results of the two species experiment have been structured in chapters that correspond to each of the different physiological processes analyzed. The present general discussion focuses on a general view of all the processes together, highlighting the most important differences. For proper discussion on specific processes, readers are addressed to the specific discussion in each chapter.

When plants are subjected to drought, they must maintain the water uptake and reduce their loss of water. In a progressive drought, *Trifolium pratense* (Tp) in monoculture reduced its water potential to balance the soil water potential and to maintain the water uptake. This decrease in water potential was due to the active reduction of the osmotic potential and, mainly, due to the diminution of turgor potential by dehydration. Instead, the water status of *Agrostis capillaris* (Ac) was not affected after 9 days of drought in monoculture, due to lower transpiration by its lower area and lower instantaneous transpiration rate, which made the relative soil water content not to drop below the threshold value of about 30%, which seems to be required for water relations to be affected.

General discussion

When drought lasted up to 16 days, Tp decreased even more its water potential to maintain the water uptake in a dryer soil. In these circumstances, the plant increased the synthesis of osmoprotectants compounds such as proline and sugars to reduce osmotic potential and the plant increased rigidity of the cell wall to reduce the turgor potential. Thus, Tp decreased its water potential by osmotic adjustment and by elastic adjustment. Although the soil water content was similar between the monocultures of Tp and Ac, the latter species showed higher water content due to its lower leaf water loss by transpiration compared to Tp. This higher leaf water content in Ac was not accompanied by a greater turgor potential, as the cell walls of Ac were more rigid than the ones of Tp. This higher rigidity of the cell wall could be caused by the higher concentration of hemicellulose; nevertheless, the cell walls of Ac in drought were more elastic than when Ac grew under well-watered conditions. It should also be noted that, in monoculture, Ac did not synthesize osmolytes.

As mentioned above, plants in drought also attempt to decrease water loss by transpiration reducing its hydraulic conductance. In this study, the main mechanism by which both species reduced their hydraulic conductance was through stomatal closure.

At elevated CO₂ and in drought conditions both species had a higher turgor potential than when they grew at ambient CO₂, through different mechanisms. Tp showed a higher osmotic adjustment through increased synthesis of sugars and proline compared to plants grown at ambient CO₂ and in water stress, whereas Ac maintained a greater turgor potential due to a less negative water potential.

In the case of Tp, a stomatal closure was observed to reduce water loss by transpiration; this fact leads to lower CO₂ diffusion to the chloroplasts, causing a lower photosynthetic rate. In addition to the stomatal limitation, Tp, in monoculture, also suffered a biochemical limitation by lower Rubisco activity on day 9. In Ac there was not a reduction in stomatal conductance after 9 days of drought, so there was no change in intercellular CO₂ concentration and in the photosynthetic rate.

When the drought period was longer, Tp, besides stomatal and biochemical limitations mentioned on day 9, also presented a photochemical limitation caused by a

reduction of the energy absorption and by a lower proportion of photons intended to photochemical processes, dispersing part of the energy captured in the form of heat through increase in non-photochemical quenching. Both mechanisms are considered traits of drought tolerance to avoid excess energy in the thylakoid electron transport chain. Ac, however, did not present a lower Rubisco activity, so the decline in photosynthetic rate was probably due to lower availability of CO₂ by stomatal closure (stomatal limitation) and lower electron transport to photochemical processes (photochemical limitation).

In combined conditions of elevated CO₂ and drought, the photosynthetic rates of both species were higher than at ambient CO₂ and drought, thanks to increased external CO₂ concentration that allowed greater diffusion of CO₂ to the chloroplasts, relieving stomatal limitation. However, there was no difference in biochemical and photochemical limitations.

When the photosynthetic rate decreases, a lower amount of NADPH and ATP by the Calvin cycle is consumed, so if absorbing light energy is not regulated and a lower proportion of energy is transferred into photochemical processes (photochemical quenching), ferredoxin can not transfer its energy to NADP⁺ because it is in its reduced form (NADPH), and thus, transfers its energy to oxygen, forming reactive oxygen species. Furthermore, the decrease in CO₂/O₂ ratio in chloroplasts caused by stomatal closure increases photorespiration and therefore the release of H₂O₂ in peroxisomes. However, none of the species presented damage to the membranes, which implies that both are able to activate their antioxidant metabolism to avoid the toxic effect of reactive oxygen species.

In the case of Tp in monoculture after 9 days of drought, the plant increased the activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase enzymes, and also increased the concentration of ascorbate and glutathione. Neither ascorbate regenerating enzymes, dehydroascorbate reductase and monodehydroascorbate reductase, were induced by drought in Tp in monoculture, even the activity was reduced. An accumulation of dehydroascorbate was not observed, so it could be deduced that the plant degrades dehydroascorbate produced or reduces it to ascorbate by other paths such

General discussion

as through electronic transfer from dihydrolipoic acid. Or, Tp synthesized ascorbate *de novo*, which could be attributed, perhaps, to the fact that in the short term is more expensive for the plant to synthesize one of the two regenerating enzymes than synthesize ascorbate *de novo*. In contrast, the higher energy requirement to synthesize glutathione made more beneficial for the plant to increase the activity of its regenerating enzyme, glutathione reductase. Due to neither the photosynthetic rate of Ac was not reduced nor the CO₂/O₂ ratio was decreased after 9 days of drought, Ac did not need to activate the antioxidant system.

Conversely, when water stress was longer (16 days of drought), in the case of Tp, ascorbate became more important in the antioxidant system to the detriment of glutathione. In addition, as well as increasing ascorbate concentration by increasing the proportion of photoassimilates allocated to synthesis like on day 9, its regeneration also increased by augmenting the activity of the monodehydroascorbate reductase enzyme.

This different response depending on the duration of the drought period might be because the plant requires a certain period of time for the induction of the enzyme activities involved in the antioxidant response, while in short-term the antioxidant metabolites would have a predominant role. In addition, the lower cost of synthesis of ascorbate compared to glutathione could be the cause that in the long-term Tp depends more on ascorbate, reducing the cost/benefit ratio.

In the case of Ac on day 16, the enzymatic activities of ascorbate peroxidase, catalase, and dehydroascorbate reductase were increased to counteract the production of reactive oxygen species in the chloroplasts and in the peroxisomes.

When the plants were grown in combined conditions of elevated CO₂ and drought, the risk of oxidative damage was minor and therefore the response of both species was similar than at ambient CO₂, but attenuated. This fact was provoked, on one hand, by the increased consumption of ATP and NADPH by higher photosynthetic rates and by higher activities of enzymes of the Calvin cycle and, on the other hand, also by the higher CO₂/O₂ ratio due to the increase in CO₂ availability in the leaves. That is, in combination of drought and elevated CO₂, the increased CO₂ concentration did not

benefit plants by a more developed antioxidant system, but by a smaller generation of reactive oxygen species.

As a result of all these changes in physiological processes, growth was reduced by drought. The water status of the plants subjected to drought was degraded, reducing their leaf relative water content and having a more negative water potential. The decrease in water potential was accompanied by loss of turgor, limiting cell expansion; at the same time, the decline of photosynthesis decreased availability of photoassimilates. Both factors led to the decline in both leaf area and the accumulation of biomass.

In addition, the root contribution to the total biomass increased, a fact that is considered a feature of plant tolerance to drought by allowing them to explore more soil and thus be able to capture more water and mineral elements.

If the components of the relative growth rate are analyzed to determine the causes of the decline in T_p , it is observed that the net assimilation rate and the specific leaf area decreased. The decrease in net assimilation rate is associated with the reduction of the photosynthetic rate, whereas the specific leaf area is related, among other mechanisms, to the thickening of the leaves by the accumulation of solutes for osmotic adjustment.

Analyzing the response of T_p depending on the duration of the drought, it can be observed that the trend is similar; however, when the drought period was longer, the incidence of drought in growth was higher. By contrast, in *Ac*, the negative effect of drought was similar on both days, but the mechanism by which the growth rate was reduced was different.

Thus, on day 9, the water potential and photosynthetic rate were not affected by drought in the monoculture of *Ac*; however, growth was diminished due to a decrease in net assimilation rate (functional component). As no differences were observed in photosynthetic rate, lower net assimilation rate was probably due to an increase in respiration to face the drought tolerance mechanisms. However, on day 16, the

General discussion

reduction in the relative growth rate was caused by a decrease in the leaf area ratio (morphological component), specifically by lower leaf weight ratio. The plant allocated a higher proportion of photoassimilates to root development; in fact, the absolute root growth was higher in drought than in well-watered conditions, while the aboveground biomass was diminished by drought. This provoked that the total photosynthetic assimilation of the plant was reduced due to a lower photosynthetic surface. No differences in net assimilation rate were observed, despite registering a decrease in CO₂ assimilation rate, implying that the respiration rate was also reduced, probably due to the lower energy requirement for the lower growth observed.

The interactive effect of elevated CO₂ and drought was similar in both species. The high CO₂ allowed both species in drought to maintain growth longer, thanks to higher photosynthetic rates. The organ most benefited by the increase in CO₂ were the roots, underlining that plants derive more photoassimilates to the organs responsible for capturing the limiting nutrient, in this case water, to the detriment of the aboveground part. These two facts (higher photosynthetic rates and higher proportion of roots) and the higher osmotic adjustment caused an increase in the net assimilation rate compared to the one obtained at ambient CO₂ and a decrease in leaf weight ratio and specific leaf area, which eventually resulted in that there was no difference in the incidence of drought in the relative growth rate between CO₂ concentrations.

When both species were grown in mixture, the response to environmental factors was different than in monoculture. Because of the lower transpiration of Ac plants than Tp plants, the transpiration in mixture was lower than in the monoculture of Tp and higher than in the monoculture of Ac, therefore, the drying rate of the soil and the water content in it were intermediate. Although there was a decrease in the water content on day 9, it did not decrease below the threshold value of 30%, so the water relations of both species were not affected.

In a longer period of drought and in a more severe drought, the water content and leaf water and turgor potential were diminished in both species. For Tp, no differences were found comparing both types of competition, whereas differences were observed in Ac. The increased competitiveness of Tp with respect to Ac for the water uptake, due to

the higher root biomass and hydraulic conductance, provoked that, in mixture, the leaf water content of Ac was lower than in monoculture and Ac reduced even more its water potential to try to keep the water uptake. To achieve this decrease in water potential, Ac increased the synthesis of proline and sugars for osmotic adjustment, which was not observed in monoculture. In addition, to prevent the drop in leaf water content to cause a massive decline in turgor potential, Ac, when grown in mixture, increased the elasticity of its cell walls to prevent loss of turgor.

As it will be mentioned later, the elevated CO₂ increased leaf area, and as a result, the transpiration surface of both species in mixture and drought was higher, so, despite the decreased stomatal conductance caused by elevated CO₂, the total transpiration was higher after nine days of drought at elevated CO₂ than at ambient CO₂ and the soil water content decreased below the threshold value. This caused lower water potential and the leaf water content to be reduced in both species. This drop in water potential did not result in a decrease in the turgor potential of Tp, due to osmotic adjustment, while the turgor potential of Ac, which did not show osmotic adjustment, was decreased.

The type of competition did not affect the water relations of Tp after 16 days of drought at elevated CO₂, and no differences were observed between the monoculture and mixture, as it was also found at ambient CO₂. In the case of Ac in mixture, the elevated CO₂ did not change the response of the water status to drought, comparing to plants grown at ambient CO₂, indicating that the observed changes were not dependent on CO₂, something that happened in monoculture. Therefore the type of competition affected the water relations of Ac at elevated CO₂ when the soil water content was similar between treatments.

Although on day 9, at ambient CO₂, the water relations of both species were not affected, both species partially closed their stomata to prevent water loss, causing a lower CO₂ input to the chloroplasts. However, this fact did not translate into a drop in photosynthetic rate in either species.

When the level of soil drought was similar in mixture and in monoculture, *i.e.*, on day 16, no differences were observed in Tp between the types of competition,

General discussion

suggesting that when the soil water content is similar between treatments, the type of competition does not affect the photosynthetic metabolism of Tp.

In Ac, in contrast, differences were observed. Although stomatal conductance levels were similar in both types of competition, intercellular CO₂ concentration was higher in mixture than in monoculture, which highlights that in mixture, in addition to a stomatal limitation, biochemical and photochemical limitations existed. This fact can be corroborated, firstly, by the lower Rubisco activity in mixture and, secondly, by the biggest drop in the electron transport rate in mixture compared to in monoculture.

As it was the case when analyzing water relations, and due to lower soil water content, the photosynthetic metabolism of both species was more affected after 9 days of drought at elevated CO₂ than at ambient CO₂. In both species, the photosynthetic rate decreased, nevertheless, in the case of Tp, the higher external CO₂ concentration allowed more CO₂ input to the leaves than at ambient CO₂, so the photosynthetic rate at elevated CO₂ and drought was similar to the one recorded under well-watered conditions at ambient CO₂. In the case of Ac, the photosynthetic rate at elevated CO₂ and in water stress was lower than at ambient CO₂ and drought, which may indicate that, in addition to a stomatal limitation due to the lower stomatal conductance, a biochemical limitation could also exist, as the high value of intercellular CO₂ concentration could point out, taking into account the level of stomatal conductance. No differences in the Rubisco activity were observed, so the biochemical limitation may be caused by an insufficient rate of regeneration of ribulose 1,5-bisphosphate to cope with the Rubisco activity. This behavior, in which, despite the greater availability of CO₂, the rate of photosynthesis was more affected by drought than at ambient CO₂ when grown in intra- and interspecific competition, could indicate that the effect of Tp competition towards Ac is greater under elevated CO₂ than under ambient CO₂.

As happened at ambient CO₂, when the soil water content in mixture was similar to monoculture, at elevated CO₂ no differences were observed in Tp between the types of competition, indicating again that when the soil water content is similar between treatments, the type of competition does not affect the photosynthetic metabolism of Tp at elevated CO₂.

In the case of Ac after 16 days of drought, the differences between monoculture and mixture were increased at elevated CO₂. Because of the lower water uptake in mixture compared to monoculture, Ac also had a lower stomatal conductance in mixture to prevent water loss more than in monoculture. This caused a lower CO₂ input to the leaves; however, intercellular CO₂ concentration was higher in mixture than in monoculture, and even higher in mixture in drought conditions than under well-watered conditions. This would indicate that, in addition to a stomatal limitation in Ac in mixture, photochemical and biochemical limitations were observed, that made CO₂ assimilation in mixture to be lower than in monoculture. A decrease in F_v/F_m was observed, indicating that Ac suffered structural damage in the photosystems, a fact that would mean a reduced ability to transfer energy, resulting in a lower generation of NADPH and ATP. The reduced availability of NADPH and ATP could provoke a decreased activity of the Calvin cycle, since in the absence of the substrates required for regeneration of ribulose 1,5-bisphosphate, Rubisco would be inhibited, therefore, decreasing CO₂ assimilation.

Given the low capacity of transferring the energy captured by the pigments and the low capacity of dissipation of this energy as heat, Ac, to mitigate the risk of photooxidative damage, reduced the concentration of its photosynthetic pigments, reducing energy capture. Chlorophyll *b* decreased more than chlorophyll *a*, indicating that the plant is decreasing the size of its antenna complex, capturing less energy thereby minimizing the photooxidative risk.

As the photosynthetic rates of Ac and Tp in mixture were not affected after 9 days of drought, the risk of oxidative damage was not increased by an imbalance between consumption and generation of ATP and NADPH. Therefore, both species did not need to activate their antioxidant metabolism.

In contrast, after a longer period of drought and in a more severe drought, the photosynthetic rates of both species were reduced in response to drought. This provoked, as detailed above, the increase in the risk of oxidative damage and therefore plants activated their antioxidant system to detoxify the reactive oxygen species generated.

General discussion

Like in previous physiological processes, the type of competition did not affect the response of Tp on day 16, indicating, therefore, that when the soil water content is similar among treatments, the type of competition did not affect antioxidant metabolism of Tp.

In contrast, in Ac, the type of competition modified the antioxidant metabolism response after 16 days of drought, specifically, the ascorbate regeneration pathway. The higher concentration of glutathione in monoculture allowed ascorbate regeneration through dehydroascorbate reductase using glutathione as electron donor, while in mixture, where glutathione concentration was lower, the enzyme induced was monodehydroascorbate reductase. As mentioned above, the lower participation of glutathione in the antioxidant metabolism is linked to an attempt by the plant to reduce the metabolic cost of avoiding the toxic effect of reactive oxygen species.

The slight decrease observed in the photosynthetic rate of Tp when it grew 9 days in elevated CO₂ and drought conditions provoked the plant to activate its antioxidant system to face the risk of oxidative damage. The response was similar to the one observed in monoculture. After a longer period and in more severe drought conditions, the photosynthetic rate was reduced in a higher percentage, and thus, the risk of oxidative damage was increased. Therefore, on day 16, Tp showed an increased antioxidant response, although, as happened on day 9, no differences between plants grown in monoculture and mixture were found.

When Ac grew at elevated CO₂, after 9 days of drought, the decline in photosynthetic rate (not registered at ambient CO₂) provoked photooxidative risk at elevated CO₂. For detoxifying reactive oxygen species, Ac increased the proportion of photoassimilates allocated to antioxidant metabolites synthesis such as ascorbate, confirming the notion that the first step of the activation of the antioxidant system is through metabolites. When drought lasted 16 days, increases of enzyme activities were also observed. The largest decline in the rate of photosynthesis in mixture compared to when grown in monoculture caused the antioxidant response to be greater in mixture, although this was not enough to detoxify reactive oxygen species and oxidative damage was observed in membranes.

As a result of the differences in these physiological processes, the type of competition influenced growth. It should be emphasized that under well-watered conditions in mixture the growth of Tp was significantly greater and the growth of Ac was significantly lower compared to the results in their respective monocultures. This was due to several factors, including higher nutrient uptake rates of Tp thanks to their higher root biomass, and greater light capture thanks to the larger height of its aboveground biomass.

In the case of Tp in mixture, on day 9, the effect of drought on growth was smaller than in monoculture, because, as mentioned above, other physiological processes were not affected. However, growth was affected, confirming that growth is one of the first plant processes altered by drought. On day 16, as noted above, no differences were observed in the response of physiological processes between types of competition; therefore, the effect of drought was similar in mixture and monoculture. However, as stated above, the growth in mixture was higher than in monoculture. These results indicate that, under drought conditions, the intraspecific competition that Tp suffers increases, while interspecific competition (due to Ac) decreases.

When Ac grew in mixture on day 9, no differences by drought were observed in growth, mainly because the water relations and the photosynthetic processes were not affected. However, after 16 days of drought, the main indicators of water status and plant photosynthetic processes showed reduced values. This resulted in a higher decrease in biomass accumulation and leaf area than the one obtained in monoculture. Moreover, in Ac in mixture, the proportion of roots was not increased, as it was observed in the other treatments, and it could be due to that for Ac in mixture the water was not the only limiting resource as possibly the light was also limiting due to the competition with Tp aboveground and belowground.

The elevated CO₂ mitigated the effect of drought in Tp in mixture, observing on both days a minor decline in growth at elevated CO₂ than at ambient CO₂, due to higher net assimilation rate.

General discussion

The growth of Ac in mixture in combined conditions of elevated CO₂ and drought was not affected on day 9, but it was affected on day 16. As seen in previous responses of physiological processes, on day 16, the effect of drought was higher than at ambient CO₂, reaching the same absolute growth in both CO₂ concentrations despite the potential beneficial effect of CO₂ in biomass accumulation. In this case, unlike what happened in Tp, the effect of intra- and interspecific competition in mixture was higher than the intraspecific competition suffered by Ac in monoculture.

That is, these changes in the growth of both species in response to water deficit and CO₂ concentration resulted in variations in the level of competitiveness of the species, as measured by the competition index: the relative competition intensity. Under well-watered conditions, Tp grew more in mixture than in monoculture, *i.e.*, for Tp growing in mixture resulted in facilitation. The opposite was observed for Ac. These could be caused, as previously discussed, by the greater competitive ability of Tp compared to Ac to obtain resources, aboveground (light and CO₂) and underground (minerals and water elements).

Drought exacerbated the differences in competitiveness between the two species. In the case of Tp, the growth of Tp in mixture compared to the growth in monoculture was higher in drought conditions than in well-watered conditions on the two days analyzed, *i.e.*, Tp experienced more facilitation in drought conditions than in well-watered conditions. In contrast, in Ac, drought caused a greater inhibition of growth in mixture than in monoculture, *i.e.*, Ac suffered greater competition in drought conditions than in well-watered conditions.

This could be caused, as mentioned above, by the higher competition suffered by Tp in monoculture (intraspecific competition) compared to the one suffered in mixture (intra- and interspecific competition simultaneously). In other words, although in mixture the biomass per plant of Tp was higher than in monoculture and therefore, its water requirement was also higher, which would increase intraspecific competition for water in mixture, the lower number of plants (6 against 12) and the low interspecific competition (due to Ac) would cause, that finally, the competition in mixture for Tp to be lower. The opposite reasoning is valid for Ac, *i.e.*, the sum of the competition of the

6 plants of Tp and the 6 of Ac in mixture is greater than the sum of competition of the 12 plants of Ac in monoculture. This is also evident when analyzing root biomass, as the sum of the root biomass of the 12 Tp plants in monoculture was higher than the sum of the 6 plants of Tp and the 6 of Ac in mixture, and the root biomass of the plants mixture was higher than the sum of the plants of Ac in monoculture. In other words, the individual competitiveness of Tp in mixture was higher than in monoculture; however, the total competition was higher in monoculture than in mixture due to two factors, first, the low individual competitiveness of Ac in mixture and, second, the lower number of individuals of Tp in mixture than in monoculture.

When plants grew under elevated CO₂, the effect of drought on Tp was higher in monoculture than in mixture, *i.e.*, the growth in mixture favored Tp more at elevated CO₂ than at ambient CO₂ in drought conditions. This caused Ac to be more affected in mixture, since the higher root biomass of Tp allowed the uptake by Tp of the scarce water, leaving Ac without that resource, causing a more negative effect on Ac in mixture at elevated CO₂ than at ambient CO₂.

If all of these results are analyzed from an applied point of view, oriented towards the use of pastures for livestock feeding, it is important to consider both productivity and the quality of them. The highest productivity was obtained in the monoculture of Tp, however, in drought conditions the gap with the mixture of Ac and Tp was narrowed, reaching at elevated CO₂ similar values of productivity between these treatments. In forage quality no differences in the *in vitro* dry matter digestibility of both species were detected, but Tp presented a C/N ratio greater than Ac, suggesting that the forage quality of Ac is greater than Tp. However, the bigger difference in productivity than in quality makes, combining quality and productivity, the recommended option to be the grassland with abundance of Tp.

9. Referencias bibliográficas

- Abadía, A., Belkhodja, R., Morales, F., Abadía, J., 1999. Effects of salinity on the photosynthetic pigment composition of barley (*Hordeum vulgare* L.) grown under a triple-line-source sprinkler system in the field. *J. Plant Physiol.* 154, 392-400.
- AbdElgawad, H., Farfan-Vignolo, E.R., Vos, D.d., Asard, H., 2015. Elevated CO₂ mitigates drought and temperature-induced oxidative stress differently in grasses and legumes. *Plant Sci.* 231, 1-10.
- Acciaresi, H.A., Guiamet, J.J., 2010. Below- and above-ground growth and biomass allocation in maize and *Sorghum halepense* in response to soil water competition. *Weed Res.* 50, 481-492.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro, in: Lester, P. (Ed.), *Methods Enzymol.* Academic Press, pp 121-126.
- Aerts, R., Boot, R.G.A., Vanderaart, P.J.M., 1991. The relation between aboveground and belowground biomass allocation patterns and competitive ability. *Oecologia* 87, 551-559.
- Ahmed, I.M., Dai, H., Zheng, W., Cao, F., Zhang, G., Sun, D., Wu, F., 2013. Genotypic differences in physiological characteristics in the tolerance to drought and salinity combined stress between Tibetan wild and cultivated barley. *Plant Physiol. Biochem.* 63, 49-60.
- Ainsworth, E.A., Davey, P.A., Hymus, G.J., Osborne, C.P., Rogers, A., Blum, H., Nösberger, J., Long, S.P., 2003. Is stimulation of leaf photosynthesis by elevated carbon dioxide concentration maintained in the long term? A test with *Lolium perenne* grown for 10 years at two nitrogen fertilization levels under Free Air CO₂ Enrichment (FACE). *Plant Cell Environ.* 26, 705-714.
- Ainsworth, E.A., Long, S.P., 2005. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytol.* 165, 351-372.
- Ainsworth, E.A., Rogers, A., 2007. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant Cell Environ.* 30, 258-270.

Referencias bibliográficas

- Akin, D.E., 1989. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. *Agron. J.* 81, 17-25.
- Akin, D.E., Kimball, B.A., Mauney, J.R., LaMorte, R.L., Hendrey, G.R., Lewin, K., Nagy, J., Gates, R.N., 1994. Influence of enhanced CO₂ concentration and irrigation on sudangrass digestibility. *Agric. For. Meteorol.* 70, 279-287.
- Alarcón, J.J., Sánchez-Blanco, M.J., Bolarín, M.C., Torrecillas, A., 1993. Water relations and osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* during short-term salt exposure and recovery. *Physiol. Plant.* 89, 441-447.
- Arnon, D.I., Hoagland, D.R., 1940. Crop production in artificial culture solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients. *Soil Sci.* 50, 463-485.
- Arrigoni, O., De Gara, L., Tommasi, F., Liso, R., 1992. Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. *Plant Physiol.* 99, 235-238.
- Asada, K., 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601-639.
- Assmann, S.M., 1993. Signal transduction in guard cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 345-375.
- Atkin, O.K., Macherel, D., 2009. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Ann. Bot.* 103, 581-597.
- Atkin, O.K., Schortemeyer, M., McFarlane, N., Evans, J.R., 1999. The response of fast- and slow-growing *Acacia* species to elevated atmospheric CO₂: an analysis of the underlying components of relative growth rate. *Oecologia* 120, 544-554.
- Azevedo, R.A., Alas, R.M., Smith, R.J., Lea, P.J., 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* 104, 280-292.
- Azoulay-Shemer, T., Palomares, A., Bagheri, A., Israelsson-Nordstrom, M., Engineer, C.B., Bargmann, B.O.R., Stephan, A.B., Schroeder, J.I., 2015. Guard cell photosynthesis is critical for stomatal turgor production, yet does not directly mediate CO₂- and ABA-induced stomatal closing. *Plant J.* 83, 567-581.
- Badiani, M., D'annibale, A., Paolacci, A., Miglietta, F., Raschi, A., 1993. The antioxidant status of soybean (*Glycine max*) leaves grown under natural CO₂ enrichment in the field. *Funct. Plant Biol.* 20, 275-284.

- Badiani, M., Paolacci, A.R., Fusari, A., Bettarini, I., Brugnoli, E., Lauteri, M., Miglietta, F., Raschi, A., 1998. Foliar antioxidant status of plants from naturally high-CO₂ sites. *Physiol. Plant.* 104, 765-771.
- Bajji, M., Lutts, S., Kinet, J.-M., 2001. Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars performing differently in arid conditions. *Plant Sci.* 160, 669-681.
- Barker, D.J., Sullivan, C.Y., Moser, L.E., 1993. Water deficit effects on osmotic potential, cell wall elasticity, and proline in five forage grasses. *Agron. J.* 85, 270-275.
- Barnes, J.D., Balaguer, L., Manrique, E., Elvira, S., Davison, A.W., 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls *a* and *b* in lichens and higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 32, 85-100.
- Bassirirad, H., Thomas, R.B., Reynolds, J.F., Strain, B.R., 1996. Differential responses of root uptake kinetics of NH₄⁺ and NO₃⁻ to enriched atmospheric CO₂ concentration in field-grown loblolly pine. *Plant Cell Environ.* 19, 367-371.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205-207.
- Beadle, C.L., 1993. Growth analysis, in: Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C., Long, S.P. (Eds.), *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*. Springer Netherlands, pp 36-46.
- Berntson, G.M., Rajakaruna, N., Bazzaz, F.A., 1998. Growth and nitrogen uptake in an experimental community of annuals exposed to elevated atmospheric CO₂. *Glob. Chang. Biol.* 4, 607-626.
- Biewenga, G.P., Haenen, G.R.M.M., Bast, A., 1997. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology: The Vascular System* 29, 315-331.
- Bloom, A.J., Chapin, F.S., Mooney, H.A., 1985. Resource Limitation in Plants-An Economic Analogy. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 16, 363-392.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E., Jensen, R.G., 1995. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7, 1099-1111.
- Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C., Minibayeva, F., 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.* 53, 1367-1376.

Referencias bibliográficas

- Bolwell, G.P., Wojtaszek, P., 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51, 347-366.
- Bowler, C., Montagu, M.V., Inze, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83-116.
- Boyer, J.S., 1968. Relationship of water potential to growth of leaves. *Plant Physiol.* 43, 1056-1062.
- Boyer, J.S., 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218, 443-448.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brilli, F., Hörtnagl, L., Hammerle, A., Haslwanter, A., Hansel, A., Loreto, F., Wohlfahrt, G., 2011. Leaf and ecosystem response to soil water availability in mountain grasslands. *Agric. For. Meteorol.* 151, 1731-1740.
- Brouwer, R., 1962a. Distribution of dry matter in the plant. *Neth. J. Agric. Sci.* 10, 361-376.
- Brouwer, R., 1962b. Nutritive influences on the distribution of dry matter in the plant. *Neth. J. Agric. Sci.* 10, 399-408.
- Brouwer, R., 1963. Functional equilibrium: sense or antisense? *Neth. J. Agric. Sci.* 31, 335-348.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation, in: Sidney, F., Lester, P. (Eds.), *Methods Enzymol.* Academic Press, pp 302-310.
- Bunce, J.A., 1998. Effects of humidity on short-term responses of stomatal conductance to an increase in carbon dioxide concentration. *Plant Cell Environ.* 21, 115-120.
- Bunce, J.A., Ziska, L.H., 1998. Decreased hydraulic conductance in plants at elevated carbon dioxide. *Plant Cell Environ.* 21, 121-126.
- Burkitt, M.J., Gilbert, B.C., 1990. Model studies of the iron-catalysed Haber-Weiss cycle and the ascorbate-driven Fenton reaction. *Free Radic. Res.* 10, 265-280.
- Cabin, R.J., Weller, S.G., Lorence, D.H., Cordell, S., Hadway, L.J., Montgomery, R., Goo, D., Urakami, A., 2002. Effects of light, alien grass, and native species additions on hawaiian dry forest restoration. *Ecol. Appl.* 12, 1595-1610.
- Caldwell, M.M., Eissenstat, D.M., Richards, J.H., Allen, M.F., 1985. Competition for phosphorus: differential uptake from dual-isotope-labeled soil interspaces between shrub and grass. *Science* 229, 384-386.

- Campbell, B.D., Stafford Smith, D.M., 2000. A synthesis of recent global change research on pasture and rangeland production: reduced uncertainties and their management implications. *Agric. Ecosyst. Environ.* 82, 39-55.
- Carter, D.R., Peterson, K.M., 1983. Effects of a CO₂-enriched atmosphere on the growth and competitive interaction of a C₃ and a C₄ grass. *Oecologia* 58, 188-193.
- Casella, E., Soussana, J.F., Loiseau, P., 1996. Long-term effects of CO₂ enrichment and temperature increase on a temperate grass sward. *Plant Soil* 182, 83-99.
- Centritto, M., 2005. Photosynthetic limitations and carbon partitioning in cherry in response to water deficit and elevated [CO₂]. *Agric. Ecosyst. Environ.* 106, 233-242.
- Centritto, M., Lee, H.S.J., Jarvis, P.G., 1999a. Interactive effects of elevated [CO₂] and drought on cherry (*Prunus avium*) seedlings I. Growth, whole-plant water use efficiency and water loss. *New Phytol.* 141, 129-140.
- Centritto, M., Lucas, M.E., Jarvis, P.G., 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 Physiol.* 22, 699-706.
- Centritto, M., Magnani, F., Lee, H.S.J., Jarvis, P.G., 1999b. Interactive effects of elevated [CO₂] and drought on cherry (*Prunus avium*) seedlings II. Photosynthetic capacity and water relations. *New Phytol.* 141, 141-153.
- Chai, Q., Jin, F., Merewitz, E., Huang, B., 2010. Growth and physiological traits associated with drought survival and post-drought recovery in perennial turfgrass species. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 135, 125-133.
- Champigny, M., Mosseau, M., 1999. Plant and crop response to trends in climatic changes, in: Pessaraki, M. (Ed.), *Handbook of Plant and Crop Stress*. CRC Press, pp 1089-1118.
- Charles, S.A., Halliwell, B., 1980. Effect of hydrogen peroxide on spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast fructose biphosphatase. *Biochem. J.* 189, 373-376.
- Chater, C., Peng, K., Movahedi, M., Dunn, Jessica A., Walker, Heather J., Liang, Y.-K., McLachlan, Deirdre H., Casson, S., Isner, Jean C., Wilson, I., Neill, Steven J., Hedrich, R., Gray, Julie E., Hetherington, Alistair M., 2015. Elevated CO₂-induced responses in stomata require ABA and ABA signaling. *Curr. Biol.* 25, 2709-2716.

Referencias bibliográficas

- Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S., 2003. Understanding plant responses to drought-from genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.* 30, 239-264.
- Chen, Y., Yu, J., Huang, B., 2015. Effects of elevated CO₂ concentration on water relations and photosynthetic responses to drought stress and recovery during rewatering in tall fescue. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 140, 19-26.
- Chimenti, C.A., Pearson, J., Hall, A.J., 2002. Osmotic adjustment and yield maintenance under drought in sunflower. *Field Crops Res.* 75, 235-246.
- Cochard, H., Coll, L., Le Roux, X., Améglio, T., 2002. Unraveling the effects of plant hydraulics on stomatal closure during water stress in walnut. *Plant Physiol.* 128, 282-290.
- Coleman, J., Mooney, H., Gorham, J., 1989. Effects of multiple stresses on radish growth and resource allocation. *Oecologia* 81, 124-131.
- Coleman, W., 1988. Tuber age as a contributory factor in the water relations of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Am. Potato J.* 65, 109-118.
- Cornic, G., 2000. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. *Trends Plant Sci.* 5, 187-188.
- Cornic, G., Massacci, A., 1996. Leaf photosynthesis under drought stress, in: Baker, N. (Ed.), *Photosynthesis and the Environment*. Springer Netherlands, pp 347-366.
- Correia, M.J., Osório, M.L., Osório, J., Barrote, I., Martins, M., David, M.M., 2006. Influence of transient shade periods on the effects of drought on photosynthesis, carbohydrate accumulation and lipid peroxidation in sunflower leaves. *Environ. Exp. Bot.* 58, 75-84.
- Cruse, B., Vesk, P.A., Liedloff, A., Wintle, B.A., 2015. Modelling both dominance and species distribution provides a more complete picture of changes to mangrove ecosystems under climate change. *Glob. Chang. Biol.* 21, 3005-3020.
- Curtis, P.S., Vogel, C.S., Pregitzer, K.S., Zak, D.R., Teeri, J.A., 1995. Interacting effects of soil fertility and atmospheric CO₂ on leaf area growth and carbon gain physiology in *Populus×euramericana* (Dode) Guinier. *New Phytol.* 129, 253-263.
- D'Antonio, C.M., Mahall, B.E., 1991. Root profiles and competition between the invasive, exotic perennial, *Carpobrotus edulis*, and two native shrub species in California coastal scrub. *Am. J. Bot.* 78, 885-894.
- D'Antonio, C.M., Vitousek, P.M., 1992. Biological invasions by exotic grasses, the grass/fire cycle, and global change. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 23, 63-87.

- DaCosta, M., Huang, B., 2006. Osmotic adjustment associated with variation in bentgrass tolerance to drought stress. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 131, 338-344.
- De Diego, N., Sampedro, M.C., Barrio, R.J., Saiz-Fernández, I., Moncaleán, P., Lacuesta, M., 2013. Solute accumulation and elastic modulus changes in six radiata pine breeds exposed to drought. *Tree Physiol.* 33, 69-80.
- de la Mata, L., Cabello, P., de la Haba, P., Agüera, E., 2012. Growth under elevated atmospheric CO₂ concentration accelerates leaf senescence in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. *J. Plant Physiol.* 169, 1392-1400.
- De Luis, I., Irigoyen, J.J., Sánchez-Díaz, M., 1999. Elevated CO₂ enhances plant growth in droughted N₂-fixing alfalfa without improving water status. *Physiol. Plant.* 107, 84-89.
- Del Pozo, A., Pérez, P., Gutiérrez, D., Alonso, A., Morcuende, R., Martínez-Carrasco, R., 2007. Gas exchange acclimation to elevated CO₂ in upper-sunlit and lower-shaded canopy leaves in relation to nitrogen acquisition and partitioning in wheat grown in field chambers. *Environ. Exp. Bot.* 59, 371-380.
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W.III, 1996. Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta* 198, 460-470.
- Dias, M.C., Brüggemann, W., 2010. Limitations of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* under drought stress: gas exchange, chlorophyll fluorescence and Calvin cycle enzymes. *Photosynthetica* 48, 96-102.
- Dijkstra, F.A., Blumenthal, D., Morgan, J.A., LeCain, D.R., Follett, R.F., 2010. Elevated CO₂ effects on semi-arid grassland plants in relation to water availability and competition. *Funct. Ecol.* 24, 1152-1161.
- Drake, B.G., González-Meler, M.A., Long, S.P., 1997. MORE EFFICIENT PLANTS: A Consequence of Rising Atmospheric CO₂? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 609-639.
- Dunnett, N.P., Grime, J.P., 1999. Competition as an amplifier of short-term vegetation responses to climate: an experimental test. *Funct. Ecol.* 13, 388-395.
- Eamus, D., 1991. The interaction of rising CO₂ and temperatures with water use efficiency. *Plant Cell Environ.* 14, 843-852.
- Edwards, E.A., Rawsthorne, S., Mullineaux, P., 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180, 278-284.

Referencias bibliográficas

- Ehleringer, J.R., Cerling, T.E., Dearing, M.D., 2002. Atmospheric CO₂ as a global change driver influencing plant-animal interactions. *Integr. Comp. Biol.* 42, 424-430.
- Eissenstat, D.M., Caldwell, M.M., 1988. Competitive ability is linked to rates of water extraction. *Oecologia* 75, 1-7.
- Ellsworth, D.S., 1999. CO₂ enrichment in a maturing pine forest: are CO₂ exchange and water status in the canopy affected? *Plant Cell Environ.* 22, 461-472.
- Elsheery, N., Cao, K.-F., 2008. Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. *Acta Physiol. Plant.* 30, 769-777.
- Epron, D., 1997. Effects of drought on photosynthesis and on the thermotolerance of photosystem II in seedlings of cedar (*Cedrus atlantica* and *C. libani*). *J. Exp. Bot.* 48, 1835-1841.
- Erice, G., Aranjuelo, I., Irigoyen, J.J., Sánchez-Díaz, M., 2007. Effect of elevated CO₂, temperature and limited water supply on antioxidant status during regrowth of nodulated alfalfa. *Physiol. Plant.* 130, 33-45.
- Erice, G., Louahlia, S., Irigoyen, J.J., Sánchez-Díaz, M., Alami, I.T., Avice, J.-C., 2011. Water use efficiency, transpiration and net CO₂ exchange of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *Environ. Exp. Bot.* 72, 123-130.
- Evans, S.E., Byrne, K.M., Lauenroth, W.K., Burke, I.C., 2011. Defining the limit to resistance in a drought-tolerant grassland: long-term severe drought significantly reduces the dominant species and increases ruderals. *J. Ecol.* 99, 1500-1507.
- Fangmeier, A., De Temmerman, L., Mortensen, L., Kemp, K., Burke, J., Mitchell, R., van Oijen, M., Weigel, H.J., 1999. Effects on nutrients and on grain quality in spring wheat crops grown under elevated CO₂ concentrations and stress conditions in the European, multiple-site experiment 'ESPACE-wheat'. *Eur. J. Agron.* 10, 215-229.
- FAO, 2007. Food and Agriculture Organization of United Nations (online). <http://faostat.fao.org>, Rome, Italy.
- FAO, 2010. Challenges and opportunities for carbon sequestration in grassland systems. A technical report on grassland management and climate change mitigation Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

- Farfan-Vignolo, E.R., Asard, H., 2012. Effect of elevated CO₂ and temperature on the oxidative stress response to drought in *Lolium perenne* L. and *Medicago sativa* L. *Plant Physiol. Biochem.* 59, 55-62.
- Faria, T., Wilkins, D., Besford, R.T., Vaz, M., Pereira, J.S., Chaves, M.M., 1996. Growth at elevated CO₂ leads to down-regulation of photosynthesis and altered response to high temperature in *Quercus suber* L. seedlings. *J. Exp. Bot.* 47, 1755-1761.
- Farooq, M., Wahid, A., Lee, D.J., Cheema, S.A., Aziz, T., 2010. Drought stress: comparative time course action of the foliar applied glycinebetaine, salicylic acid, nitrous oxide, brassinosteroids and spermine in improving drought resistance of rice. *J. Agron. Crop Sci.* 196, 336-345.
- Farrar, J.F., 1992. The whole plant: carbon partitioning during development, in: Pollock, C.J., Farrar, J.F., Gordon, A.J. (Eds.), *Carbon partitioning within and between organs*. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK, pp 163-180.
- Ferris, R., Taylor, G., 1994. Increased root growth in elevated CO₂: a biophysical analysis of root cell elongation. *J. Exp. Bot.* 45, 1603-1612.
- Ferris, R., Taylor, G., 1995. Contrasting effects of elevated CO₂ and water deficit on two native herbs. *New Phytol.* 131, 491-501.
- Field, C.B., Chapin III, F.S.C., Matson, P.A., Mooney, H.A., 1992. Responses of terrestrial ecosystems to the changing atmosphere: A resource-based approach. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 23, 201-235.
- Findelee, P., Goldbach, H.E., 1996. Rapid effects of boron deficiency on cell wall elasticity modulus in *Cucurbita pepo* roots. *Botanica Acta* 109, 463-465.
- Flexas, J., Bota, J., Escalona, J.M., Sampol, B., Medrano, H., 2002. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Funct. Plant Biol.* 29, 461-471.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., Sharkey, T.D., 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C₃ plants. *Plant Biol.* 6, 269-279.
- Flexas, J., Escalona, J.M., Medrano, H., 1999. Water stress induces different levels of photosynthesis and electron transport rate regulation in grapevines. *Plant Cell Environ.* 22, 39-48.
- Flexas, J., Medrano, H., 2002a. Drought-inhibition of photosynthesis in C₃ plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Ann. Bot.* 89, 183-189.

Referencias bibliográficas

- Flexas, J., Medrano, H., 2002b. Energy dissipation in C₃ plants under drought. *Funct. Plant Biol.* 29, 1209-1215.
- Foyer, C.H., Descourvières, P., Kunert, K.J., 1994. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17, 507-523.
- Foyer, C.H., Harbinson, J., 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport, in: Foyer, C.H., Mullineaux, P. (Eds.), *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 1-43.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2000. Tansley Review No. 112. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol.* 146, 359-388.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2011. Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiol.* 155, 2-18.
- Foyer, C.H., Souriau, N., Perret, S., Lelandais, M., Kunert, K.J., Pruvost, C., Jouanin, L., 1995. Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiol.* 109, 1047-1057.
- Franklin, J.A., Zwiazek, J.J., 2004. Ion uptake in *Pinus banksiana* treated with sodium chloride and sodium sulphate. *Physiol. Plant.* 120, 482-490.
- Fredeen, A.L., Koch, G.W., Field, C.B., 1998. Influence of fertilization and atmospheric CO₂ enrichment on ecosystem CO₂ and H₂O exchanges in single- and multiple-species grassland microcosms. *Environ. Exp. Bot.* 40, 147-157.
- Frehner, M., Lüscher, A., Hebeisen, T., Zanetti, S., Schubiger, F., Scalet, M., 1997. Effects of elevated partial pressure of carbon dioxide and season of the year on forage quality and cyanide concentration of *Trifolium repens* L. from a FACE experiment. *Acta Oecol.* 18, 297-304.
- Frottin, F., Espagne, C., Traverso, J.A., Mauve, C., Valot, B., Lelarge-Trouverie, C., Zivy, M., Noctor, G., Meinel, T., Giglione, C., 2009. Cotranslational proteolysis dominates glutathione homeostasis to support proper growth and development. *Plant Cell* 21, 3296-3314.
- Galano, A., Alvarez-Idaboy, J.R., 2011. Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals. *RSC Advances* 1, 1763-1771.
- Galmés, J., Abadía, A., Medrano, H., Flexas, J., 2007. Photosynthesis and photoprotection responses to water stress in the wild-extinct plant *Lysimachia minoricensis*. *Environ. Exp. Bot.* 60, 308-317.

- Gauthier, P.P.G., Crous, K.Y., Ayub, G., Duan, H., Weerasinghe, L.K., Ellsworth, D.S., Tjoelker, M.G., Evans, J.R., Tissue, D.T., Atkin, O.K., 2014. Drought increases heat tolerance of leaf respiration in *Eucalyptus globulus* saplings grown under both ambient and elevated atmospheric [CO₂] and temperature. *J. Exp. Bot.* 65, 6471-6485.
- 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 Environ.* 22, 1177-1199.
- Genty, B., Briantais, J.-M., Baker, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 990, 87-92.
- Gest, N., Gautier, H., Stevens, R., 2013. Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *J. Exp. Bot.* 64, 33-53.
- Gifford, R.M., Barrett, D.J., Lutze, J.L., 2000. The effects of elevated [CO₂] on the C:N and C:P mass ratios of plant tissues. *Plant Soil* 224, 1-14.
- Gillham, D.J., Dodge, A.D., 1986. Hydrogen-peroxide-scavenging systems within pea chloroplasts. *Planta* 167, 246-251.
- Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., Pelicci, P.G., 2007. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 722-728.
- Girma, F.S., Krieg, D.R., 1992. Osmotic adjustment in sorghum: I. mechanisms of diurnal osmotic potential changes. *Plant Physiol.* 99, 577-582.
- Gomez, L.D., Noctor, G., Knight, M.R., Foyer, C.H., 2004. Regulation of calcium signalling and gene expression by glutathione. *J. Exp. Bot.* 55, 1851-1859.
- Gordon, D.R., Menke, J.M., Rice, K.J., 1989. Competition for soil water between annual plants and blue oak (*Quercus douglasii*) seedlings. *Oecologia* 79, 533-541.
- Goverde, M., Arnone III, J.A., Erhardt, A., 2002. Species-specific reactions to elevated CO₂ and nutrient availability in four grass species. *Basic Appl. Ecol.* 3, 221-227.
- Grace, J.B., 1995. On the measurement of plant competition intensity. *Ecology* 76, 305-308.

Referencias bibliográficas

- Greiner La Peyre, M.K., Grace, J.B., Hahn, E., Mendelssohn, I.A., 2001. The importance of competition in regulating plant species abundance along a salinity gradient. *Ecology* 82, 62-69.
- Griffith, O.W., 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106, 207-212.
- Grossman-Clarke, S., Pinter, P.J., Kartschall, T., Kimball, B.A., Hunsaker, D.J., Wall, G.W., Garcia, R.L., LaMorte, R.L., 2001. Modelling a spring wheat crop under elevated CO₂ and drought. *New Phytol.* 150, 315-335.
- Gunderson, C., Wullschleger, S., 1994. Photosynthetic acclimation in trees to rising atmospheric CO₂: A broader perspective. *Photosynthesis Res.* 39, 369-388.
- Hardacre, A.K., Laing, W.A., Christeller, J.T., 1986. The response of simulated swards of perennial ryegrass and white clover to enriched atmospheric CO₂: Interaction with nitrogen and photosynthetic photon flux density. *N. Z. J. Agric. Res.* 29, 567-573.
- Hartley, S.E., Mitchell, R.J., 2005. Manipulation of nutrients and grazing levels on heather moorland: changes in *Calluna* dominance and consequences for community composition. *J. Ecol.* 93, 990-1004.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K., 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207, 604-611.
- Hossain, M.A., Asada, K., 1984. Inactivation of Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts on Dark Addition of Hydrogen Peroxide: Its Protection by Ascorbate. *Plant Cell Physiol.* 25, 1285-1295.
- Hsiao, T.C., 1973. Plant Responses to Water Stress. *Annual Review of Plant Physiology* 24, 519-570.
- Hsiao, T.C., Acevedo, E., Fereres, E., Henderson, D.W., 1976. Water Stress, Growth, and Osmotic Adjustment. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 273, 479-500.
- Hu, Y.-L., Hu, Y., Zeng, D.-H., Tan, X., Chang, S.X., 2015. Exponential fertilization and plant competition effects on the growth and N nutrition of trembling aspen and white spruce seedlings. *Can. J. For. Res.* 45, 78-86.
- Hymus, G.J., Baker, N.R., Long, S.P., 2001. Growth in elevated CO₂ can both increase and decrease photochemistry and photoinhibition of photosynthesis in a predictable manner. *Dactylis glomerata* grown in two levels of nitrogen nutrition. *Plant Physiol.* 127, 1204-1211.

- Iannucci, A., Russo, M., Arena, L., Di Fonzo, N., Martiniello, P., 2002. Water deficit effects on osmotic adjustment and solute accumulation in leaves of annual clovers. *Eur. J. Agron.* 16, 111-122.
- Inoue, K., Matsuura, T., Saito, I., 1985. Importance of single electron-transfer in singlet oxygen reaction in aqueous solution: Oxidation of electron-rich thioanisoles. *Tetrahedron* 41, 2177-2181.
- IPCC, 2007. Climate change 2007: impacts, adaptation and vulnerability working group contribution to the Intergovernmental Panel on Climate Change. Fourth Assessment Report. Summary for Policymakers. Brussels.
- IPCC, 2013. Carbon and other biogeochemical cycles, in: Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., Midgley, P.M. (Eds.), *Climate change 2013: The physical science basis. Working group I contribution to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- IPCC, 2014. Climate change 2014: Synthesis report. Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change Geneva, Switzerland.
- Jefferies, R.A., 1993. Responses of potato genotypes to drought. I. Expansion of individual leaves and osmotic adjustment. *Ann. Appl. Biol.* 122, 93-104.
- Jiang, Q., Zhang, J., Guo, X., Bedair, M., Sumner, L., Bouton, J., Wang, Z., 2010. Improvement of drought tolerance in white clover (*Trifolium repens*) by transgenic expression of a transcription factor gene WXP1. *Funct. Plant Biol.* 37, 157-165.
- Jiang, Y.P., Cheng, F., Zhou, Y.H., Xia, X.J., Shi, K., Yu, J.Q., 2012. Interactive effects of CO₂ enrichment and brassinosteroid on CO₂ assimilation and photosynthetic electron transport in *Cucumis sativus*. *Environ. Exp. Bot.* 75, 98-106.
- Johnson, J.D., Tognetti, R., Paris, P., 2002. Water relations and gas exchange in poplar and willow under water stress and elevated atmospheric CO₂. *Physiol. Plant.* 115, 93-100.
- Kadir, S., Von Weihe, M., Al-Khatib, K., 2007. Photochemical efficiency and recovery of photosystem II in grapes after exposure to sudden and gradual heat stress. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 132, 764-769.

Referencias bibliográficas

- Kaiser, W., 1979. Reversible inhibition of the calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta* 145, 377-382.
- Kaldenhoff, R., Ribas-Carbo, M., Sans, J.F., Lovisolo, C., Heckwolf, M., Uehlein, N., 2008. Aquaporins and plant water balance. *Plant Cell Environ.* 31, 658-666.
- Kimball, B.A., 1983. Carbon Dioxide and Agricultural Yield: An Assemblage and Analysis of 430 Prior Observations. *Agron. J.* 75, 779-788.
- Knox, J.P., Dodge, A.D., 1985. Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry* 24, 889-896.
- Koricheva, J., 1999. Interpreting phenotypic variation in plant allelochemistry: problems with the use of concentrations. *Oecologia* 119, 467-473.
- Körner, C., 1995. Towards a better experimental basis for upscaling plant responses to elevated CO₂ and climate warming. *Plant Cell Environ.* 18, 1101-1110.
- Kozlowski, T.T., Kramer, P.J., Pallardy, S.G., 1991. Water Stress, in: Pallardy, S.G., Kozlowski, T.T., Kramer, P.J. (Eds.), *The Physiological Ecology of Woody Plants*. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp 247-302.
- Krause, G.H., Weis, E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 313-349.
- Lambers, H., 1983. The 'functional equilibrium': Nibbling on the edges of a paradigm. *Neth. J. Agric. Sci.* 31, 305-311.
- Lambers, H., Cambridge, M.L., Konings, H., Pons, T.L., 1989. *Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants*. SPB Academic Publisher, The Hague.
- Lambers, H., Chapin, F.S., III, Pons, T., 2008. Growth and allocation, *Plant Physiological Ecology*. Springer New York, pp 321-374.
- Lawlor, D.W., Cornic, G., 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ.* 25, 275-294.
- Lawlor, D.W., Keys, A.J., 1993. Understanding photosynthetic adaptation to changing climate in: Fowden, L., Mansfield, T.A., Stoddart, J. (Eds.), *Plant adaptation to environmental stress*. Chapman and Hall, London, United Kingdom pp 85-106.
- Lawlor, D.W., Tezara, W., 2009. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Ann. Bot.* 103, 561-579.

- Leakey, A.D.B., Ainsworth, E.A., Bernacchi, C.J., Rogers, A., Long, S.P., Ort, D.R., 2009a. Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *J. Exp. Bot.* 60, 2859-2876.
- Leakey, A.D.B., Xu, F., Gillespie, K.M., McGrath, J.M., Ainsworth, E.A., Ort, D.R., 2009b. Genomic basis for stimulated respiration by plants growing under elevated carbon dioxide. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 3597-3602.
- Lechtenberg, V.L., Holt, D.A., Youngberg, H.W., 1971. Diurnal variation in nonstructural carbohydrates, *in vitro* digestibility, and leaf to stem ratio of alfalfa. *Agron. J.* 63, 719-724.
- Lee, B.-R., Jin, Y.-L., Jung, W.-J., Avice, J.-C., Morvan-Bertrand, A., Ourry, A., Park, C.-W., Kim, T.-H., 2008. Water-deficit accumulates sugars by starch degradation—not by de novo synthesis—in white clover leaves (*Trifolium repens*). *Physiol. Plant.* 134, 403-411.
- Lee, T.D., Barrott, S.H., Reich, P.B., 2011. Photosynthetic responses of 13 grassland species across 11 years of free-air CO₂ enrichment is modest, consistent and independent of N supply. *Glob. Chang. Biol.* 17, 2893-2904.
- Leustek, T., Saito, K., 1999. Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol.* 120, 637-644.
- Levy, D., 1983. Varietal differences in the response of potatoes to repeated short periods of water stress in hot climates. 2. Tuber yield and dry matter accumulation and other tuber properties. *Potato Res* 26, 315-321.
- Liu, F., Stützel, H., 2002. Leaf water relations of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.) in response to soil drying. *Eur. J. Agron.* 16, 137-150.
- Loggini, B., Scartazza, A., Brugnoli, E., Navari-Izzo, F., 1999. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiol.* 119, 1091-1100.
- Lucero, D.W., Grieu, P., Guckert, A., 1999. Effects of water deficit and plant interaction on morphological growth parameters and yield of white clover (*Trifolium repens* L.) and ryegrass (*Lolium perenne* L.) mixtures. *Eur. J. Agron.* 11, 167-177.
- Lucero, D.W., Grieu, P., Guckert, A., 2000. Water deficit and plant competition effects on growth and water-use efficiency of white clover (*Trifolium repens*, L.) and ryegrass (*Lolium perenne*, L.). *Plant Soil* 227, 1-15.
- Lüscher, A., Hebeisen, T., Zanetti, S., Hartwig, U., Blum, H., Hendrey, G., Nösberger, J., 1996. Differences between legumes and nonlegumes of permanent grassland in their responses to free-air carbon dioxide enrichment: its effect on competition in

- a multispecies mixture, in: Bazzaz, F.A. (Ed.), Carbon Dioxide, Populations, and Communities Academic Press, San Diego, CA, pp 287-300.
- Maestre, F.T., Valladares, F., Reynolds, J.F., 2005. Is the change of plant–plant interactions with abiotic stress predictable? A meta-analysis of field results in arid environments. *J. Ecol.* 93, 748-757.
- Majumdar, S., Ghosh, S., Glick, B.R., Dumbroff, E.B., 1991. Activities of chlorophyllase, phosphoenolpyruvate carboxylase and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in the primary leaves of soybean during senescence and drought. *Physiol. Plant.* 81, 473-480.
- Manderscheid, R., Erbs, M., Weigel, H.-J., 2014. Interactive effects of free-air CO₂ enrichment and drought stress on maize growth. *Eur. J. Agron.* 52, Part A, 11-21.
- Manning, W.J., v. Tiedemann, A., 1995. Climate change: Potential effects of increased atmospheric Carbon dioxide (CO₂), ozone (O₃), and ultraviolet-B (UV-B) radiation on plant diseases. *Environ. Pollut.* 88, 219-245.
- Marabottini, R., Schraml, C., Paolacci, A.R., Sorgona, A., Raschi, A., Rennenberg, H., Badiani, M., 2001. Foliar antioxidant status of adult Mediterranean oak species (*Quercus ilex* L. and *Q. pubescens* Willd.) exposed to permanent CO₂-enrichment and to seasonal water stress. *Environ. Pollut.* 115, 413-423.
- Markesteyn, L., Poorter, L., 2009. Seedling root morphology and biomass allocation of 62 tropical tree species in relation to drought- and shade-tolerance. *J. Ecol.* 97, 311-325.
- Marques da Silva, J., Arrabaça, M.C., 2004. Contributions of soluble carbohydrates to the osmotic adjustment in the C₄ grass *Setaria sphacelata*: A comparison between rapidly and slowly imposed water stress. *J. Plant Physiol.* 161, 551-555.
- Marron, N., Dreyer, E., Boudouresque, E., Delay, D., Petit, J.-M., Delmotte, F.M., Brignolas, F., 2003. Impact of successive drought and re-watering cycles on growth and specific leaf area of two *Populus × canadensis* (Moench) clones, ‘Dorskamp’ and ‘Luisa_Avanzo’. *Tree Physiol.* 23, 1225-1235.
- Marshall, J.G., Dumbroff, E.B., 1999. Turgor regulation via cell wall adjustment in white spruce. *Plant Physiol.* 119, 313-320.
- Martínez, J.-P., Lutts, S., Schanck, A., Bajji, M., Kinet, J.-M., 2004. Is osmotic adjustment required for water stress resistance in the Mediterranean shrub *Atriplex halimus* L.? *J. Plant Physiol.* 161, 1041-1051.

- Martínez, J.P., Silva, H., Ledent, J.F., Pinto, M., 2007. Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Eur. J. Agron.* 26, 30-38.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocyanin (hemocyanin). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- McLeod, M.N., Minson, D.J., 1980. A note on Onozuka 3S cellulase as a replacement for Onozuka SS (P1500) cellulase when estimating forage digestibility in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 5, 347-350.
- Medrano, H., Parry, M.A.J., Socias, X., Lawlor, D.W., 1997. Long term water stress inactivates Rubisco in subterranean clover. *Ann. Appl. Biol.* 131, 491-501.
- Melgoza, G., Nowak, R., Tausch, R., 1990. Soil water exploitation after fire: competition between *Bromus tectorum* (cheatgrass) and two native species. *Oecologia* 83, 7-13.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405-410.
- Mittler, R., Zilinskas, B.A., 1994. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant J.* 5, 397-405.
- Mooney, H.A., Drake, B.G., Luxmoore, R.J., Oechel, W.C., Pitelka, L.F., 1991. Predicting Ecosystem Responses to Elevated CO₂ Concentrations. *Bioscience* 41, 96-104.
- Moore, B.D., Cheng, S.H., Sims, D., Seemann, J.R., 1999. The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant Cell Environ.* 22, 567-582.
- Morgan, J.A., LeCain, D.R., Mosier, A.R., Milchunas, D.G., 2001. Elevated CO₂ enhances water relations and productivity and affects gas exchange in C₃ and C₄ grasses of the Colorado shortgrass steppe. *Glob. Chang. Biol.* 7, 451-466.
- Morgan, J.A., LeCain, D.R., Pendall, E., Blumenthal, D.M., Kimball, B.A., Carrillo, Y., Williams, D.G., Heisler-White, J., Dijkstra, F.A., West, M., 2011. C₄ grasses prosper as carbon dioxide eliminates desiccation in warmed semi-arid grassland. *Nature* 476, 202-205.
- Morgan, J.A., Mosier, A.R., Milchunas, D.G., LeCain, D.R., Nelson, J.A., Parton, W.J., 2004. CO₂ enhances productivity of the shortgrass steppe, alters species composition and reduces forage digestibility. *Ecol. Appl.* 14, 208-219.

Referencias bibliográficas

- Morse, S.R., Wayne, P., Miao, S.L., Bazzaz, F.A., 1993. Elevated CO₂ and drought alter tissue water relations of birch (*Betula populifolia* Marsh.) seedlings. *Oecologia* 95, 599-602.
- Müller, P., Li, X.-P., Niyogi, K.K., 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125, 1558-1566.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L., 2000. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210, 925-931.
- Munns, R., 1988. Why Measure Osmotic Adjustment? *Funct. Plant Biol.* 15, 717-726.
- Munoz, A.E., Weaver, R.W., 1999. Competition between subterranean clover and ryegrass for uptake of ¹⁵N-labeled fertilizer. *Plant Soil* 211, 173-178.
- Nakano, H., Muramatsu, S., Makino, A., Mae, T., 2000. Relationship between the suppression of photosynthesis and starch accumulation in the pod-removed bean. *Funct. Plant Biol.* 27, 167-173.
- Naudts, K., Van den Berge, J., Farfan, E., Rose, P., AbdElgawad, H., Ceulemans, R., Janssens, I.A., Asard, H., Nijs, I., 2014. Future climate alleviates stress impact on grassland productivity through altered antioxidant capacity. *Environ. Exp. Bot.* 99, 150-158.
- Naudts, K., Van den Berge, J., Janssens, I.A., Nijs, I., Ceulemans, R., 2011. Does an extreme drought event alter the response of grassland communities to a changing climate? *Environ. Exp. Bot.* 70, 151-157.
- Naudts, K., Van den Berge, J., Janssens, I.A., Nijs, I., Ceulemans, R., 2013. Combined effects of warming and elevated CO₂ on the impact of drought in grassland species. *Plant Soil* 369, 497-507.
- Navas, M.L., Garnier, E., Austin, M.P., Gifford, R.M., 1999. Effect of competition on the responses of grasses and legumes to elevated atmospheric CO₂ along a nitrogen gradient: differences between isolated plants, monocultures and multi-species mixtures. *New Phytol.* 143, 323-331.
- Niklaus, P.A., Wohlfender, M., Siegwolf, R., Körner, C., 2001. Effects of six years atmospheric CO₂ enrichment on plant, soil, and soil microbial C of a calcareous grassland. *Plant Soil* 233, 189-202.
- Noctor, G., Arisi, A.-C.M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Rennenberg, H., Foyer, C.H., 1998. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J. Exp. Bot.* 49, 623-647.

- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249-279.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L., Foyer, C.H., 2002. Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: A predominant role for photorespiration? *Ann. Bot.* 89, 841-850.
- Nowak, R.S., Ellsworth, D.S., Smith, S.D., 2004a. Functional responses of plants to elevated atmospheric CO₂— do photosynthetic and productivity data from FACE experiments support early predictions? *New Phytol.* 162, 253-280.
- Nowak, R.S., Zitzer, S.F., Babcock, D., Smith-Longozo, V., Charlet, T.N., Coleman, J.S., Seemann, J.R., Smith, S.D., 2004b. Elevated atmospheric CO₂ does not conserve soil water in the mojave desert. *Ecology* 85, 93-99.
- OECD/FAO, 2011. OECD-FAO Agricultural Outlook 2011. OECD Publishing, Paris.
- O'Mara, F.P., 2012. The role of grasslands in food security and climate change. *Ann. Bot.* 110, 1263-1270.
- Ort, D.R., 2001. When there is too much light. *Plant Physiol.* 125, 29-32.
- Overdieck, D., 1986. Long-term effects of an increased CO₂ concentration on terrestrial plants in model ecosystems. Morphology and reproduction of *Trifolium repens* L. and *Lolium perenne* L. *Int. J. Biometeorol.* 30, 323-332.
- Owensby, C.E., Cochran, R.C., Auen, L.M., 1996. Effects of elevated carbon dioxide on forage quality for ruminants. *Carbon Dioxide, Populations, and Communities (Physiologic Ecology Series)*, 363-371.
- Owensby, C.E., Coyne, P.I., Ham, J.M., Auen, L.M., Knapp, A.K., 1993. Biomass production in a tallgrass prairie ecosystem exposed to ambient and elevated CO₂. *Ecol. Appl.* 3, 644-653.
- Page, M., Sultana, N., Paszkiewicz, K., Florance, H., Smirnoff, N., 2012. The influence of ascorbate on anthocyanin accumulation during high light acclimation in *Arabidopsis thaliana*: further evidence for redox control of anthocyanin synthesis. *Plant Cell Environ.* 35, 388-404.
- Parry, M.A.J., Andralojc, P.J., Khan, S., Lea, P.J., Keys, A.J., 2002. Rubisco activity: Effects of drought stress. *Ann. Bot.* 89, 833-839.
- Peeters, A., 2004. Wild and sown grasses, profiles of a temperate species selection: Ecology, biodiversity and use. FAO & Blackwell Publishing, Rome/London.

- Pelleschi, S., Rocher, J.P., Prioul, J.L., 1997. Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. *Plant Cell Environ.* 20, 493-503.
- Peña-Rojas, K., Aranda, X., Fleck, I., 2004. Stomatal limitation to CO₂ assimilation and down-regulation of photosynthesis **ihogn** *Quercus ilex* resprouts in response to slowly imposed drought. *Tree Physiol.* 24, 813-822.
- Pérez-López, U., 2008. Respuestas fisiológicas de la cebada a la interacción de la salinidad y el elevado CO₂ -Prospección ante el cambio climático-, Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco/EHU, Leioa.
- Pérez-López, U., Miranda-Apodaca, J., Mena-Petite, A., Muñoz-Rueda, A., 2013a. Barley growth and its underlying components are affected by elevated CO₂ and salt concentration. *J. Plant Growth Regul.* 32, 732-744.
- Pérez-López, U., Miranda-Apodaca, J., Mena-Petite, A., Muñoz-Rueda, A., 2014. Responses of nutrient dynamics in barley seedlings to the interaction of salinity and carbon dioxide enrichment. *Environ. Exp. Bot.* 99, 86-99.
- Pérez-López, U., Miranda-Apodaca, J., Muñoz-Rueda, A., Mena-Petite, A., 2013b. Lettuce production and antioxidant capacity are differentially modified by salt stress and light intensity under ambient and elevated CO₂. *J. Plant Physiol.* 170, 1517-1525.
- Pérez-López, U., Robredo, A., Lacuesta, M., Mena-Petite, A., Muñoz-Rueda, A., 2009a. The impact of salt stress on the water status of barley plants is partially mitigated by elevated CO₂. *Environ. Exp. Bot.* 66, 463-470.
- Pérez-López, U., Robredo, A., Lacuesta, M., Mena-Petite, A., Muñoz-Rueda, A., 2012. Elevated CO₂ reduces stomatal and metabolic limitations on photosynthesis caused by salinity in *Hordeum vulgare*. *Photosynthesis Res.* 111, 269-283.
- Pérez-López, U., Robredo, A., Lacuesta, M., Muñoz-Rueda, A., Mena-Petite, A., 2010a. Atmospheric CO₂ concentration influences the contributions of osmolyte accumulation and cell wall elasticity to salt tolerance in barley cultivars. *J. Plant Physiol.* 167, 15-22.
- Pérez-López, U., Robredo, A., Lacuesta, M., Sgherri, C., Mena-Petite, A., Navari-Izzo, F., Muñoz-Rueda, A., 2010b. Lipoic acid and redox status in barley plants subjected to salinity and elevated CO₂. *Physiol. Plant.* 139, 256-268.
- Pérez-López, U., Robredo, A., Lacuesta, M., Sgherri, C., Muñoz-Rueda, A., Navari-Izzo, F., Mena-Petite, A., 2009b. The oxidative stress caused by salinity in two barley cultivars is mitigated by elevated CO₂. *Physiol. Plant.* 135, 29-42.

- Pérez, P., Morcuende, R., Martín del Molino, I., Martínez-Carrasco, R., 2005. Diurnal changes of Rubisco in response to elevated CO₂, temperature and nitrogen in wheat grown under temperature gradient tunnels. *Environ. Exp. Bot.* 53, 13-27.
- Perry, L.G., Shafroth, P.B., Blumenthal, D.M., Morgan, J.A., LeCain, D.R., 2013. Elevated CO₂ does not offset greater water stress predicted under climate change for native and exotic riparian plants. *New Phytol.* 197, 532-543.
- Peterson, P.R., Sheaffer, C.C., Hall, M.H., 1992. Drought effects on perennial forage legume yield and quality. *Agron. J.* 84, 774-779.
- Picon-Cochard, C., Teyssonneyre, F., Besle, J.M., Soussana, J.F., 2004. Effects of elevated CO₂ and cutting frequency on the productivity and herbage quality of a semi-natural grassland. *Eur. J. Agron.* 20, 363-377.
- Picon, C., Guehl, J., Aussenac, G., 1996. Growth dynamics, transpiration and water-use efficiency in *Quercus robur* plants submitted to elevated CO₂ and drought. *Ann. For. Sci.* 53, 431-446.
- Polle, A., 1996. Protection from oxidative stress in trees as affected by elevated CO₂ and environmental stress, in: Koch, G.W., A., M.H. (Eds.), *Carbon dioxide and terrestrial ecosystems*. Academic Press, New York, pp 299-315.
- Polle, A., Pfirrmann, T., Chakrabarti, S., Rennenberg, H., 1993. The effects of enhanced ozone and enhanced carbon dioxide concentrations on biomass, pigments and antioxidative enzymes in spruce needles (*Picea abies* L.). *Plant Cell Environ.* 16, 311-316.
- Polley, H.W., Jin, V.L., Fay, P.A., 2012. CO₂-caused change in plant species composition rivals the shift in vegetation between mid-grass and tallgrass prairies. *Glob. Chang. Biol.* 18, 700-710.
- Polley, H.W., Johnson, H.B., Derner, J.D., 2002. Soil- and plant-water dynamics in a C₃/C₄ grassland exposed to a subambient to superambient CO₂ gradient. *Glob. Chang. Biol.* 8, 1118-1129.
- Polley, H.W., Johnson, H.B., Derner, J.D., 2003. Increasing CO₂ from subambient to superambient concentrations alters species composition and increases above-ground biomass in a C₃/C₄ grassland. *New Phytol.* 160, 319-327.
- Pompelli, M.F., Barata-Luís, R., Vitorino, H.S., Gonçalves, E.R., Rolim, E.V., Santos, M.G., Almeida-Cortez, J.S., Ferreira, V.M., Lemos, E.E., Endres, L., 2010. Photosynthesis, photoprotection and antioxidant activity of purging nut under drought deficit and recovery. *Biomass Bioener.* 34, 1207-1215.

Referencias bibliográficas

- Poorter, H., 1993. Interspecific variation in the growth response of plants to an elevated ambient CO₂ concentration. *Vegetatio* 104-105, 77-97.
- Poorter, H., Nagel, O., 2000. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Funct. Plant Biol.* 27, 595-607.
- Poorter, H., Navas, M.L., 2003. Plant growth and competition at elevated CO₂: on winners, losers and functional groups. *New Phytol.* 157, 175-198.
- Poorter, H., Pérez-Soba, M., 2002. Plant Growth at elevated CO₂, in: Mooney, H.A., Canadell, J.G. (Eds.), *Encyclopedia of global environmental change, Volumen 2: The earth system: biological and ecological dimensions of global environment changes.* John Wiley & Sons, Ltd Chichester, pp 489-496.
- Poorter, H., van der Werf, A., 1998. Is inherent variation in RGR determined by LAR at low irradiance and by NAR at high irradiance? A review of herbaceous species, in: Lambers, H., Poorter, H., Van Vuuren, M.M.I. (Eds.), *Inherent Variation in Plant Growth. Physiological Mechanisms and Ecological Consequences.* Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands, pp 309-336.
- Poorter, H., Villar, R., 1997. The fate of acquired carbon in plants: chemical composition and construction costs, in: Bazzaz, F.A., Grace, J. (Eds.), *Plant resource allocation* Academic Press, New York, pp 39-72.
- Pullerits, T., Sundström, V., 1996. Photosynthetic light-harvesting pigment-protein complexes: Toward understanding how and why. *Acc. Chem. Res.* 29, 381-389.
- Rao, M.V., Hale, B.A., Ormrod, D.P., 1995. Amelioration of ozone-induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide (role of antioxidant enzymes). *Plant Physiol.* 109, 421-432.
- Rasineni, G.K., Guha, A., Reddy, A.R., 2011. Elevated atmospheric CO₂ mitigated photoinhibition in a tropical tree species, *Gmelina arborea*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 103, 159-165.
- Raven, J.A., Handley, L.L., Andrews, M., 2004. Global aspects of C/N interactions determining plant-environment interactions. *J. Exp. Bot.* 55, 11-25.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V., Vivekanandan, M., 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* 161, 1189-1202.
- Reekie, E.G., Bazzaz, F.A., 1989. Competition and patterns of resource use among seedlings of five tropical trees grown at ambient and elevated CO₂. *Oecologia* 79, 212-222.

- Reichheld, J.-P., Khafif, M., Riondet, C., Droux, M., Bonnard, G., Meyer, Y., 2007. Inactivation of thioredoxin reductases reveals a complex interplay between thioredoxin and glutathione pathways in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 19, 1851-1865.
- Renou, J.-L., Gerbaud, A., Just, D., André, M., 1990. Differing substomatal and chloroplastic CO₂ concentrations in water-stressed wheat. *Planta* 182, 415-419.
- Ribas-Carbo, M., Taylor, N.L., Giles, L., Busquets, S., Finnegan, P.M., Day, D.A., Lambers, H., Medrano, H., Berry, J.A., Flexas, J., 2005. Effects of water stress on respiration in soybean leaves. *Plant Physiol.* 139, 466-473.
- Richardson, S.J., Press, M.C., Parsons, A.N., Hartley, S.E., 2002. How do nutrients and warming impact on plant communities and their insect herbivores? A 9-year study from a sub-Arctic heath. *J. Ecol.* 90, 544-556.
- Rivelli, A.R., James, R.A., Munns, R., Condon, A.G., 2002. Effect of salinity on water relations and growth of wheat genotypes with contrasting sodium uptake. *Funct. Plant Biol.* 29, 1065-1074.
- 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 CO₂ concentrations. *Biol. Plant.* 54, 285-292.
- Robredo, A., Pérez-López, U., Miranda-Apodaca, J., Lacuesta, M., Mena-Petite, A., Muñoz-Rueda, A., 2011. Elevated CO₂ reduces the drought effect on nitrogen metabolism in barley plants during drought and subsequent recovery. *Environ. Exp. Bot.* 71, 399-408.
- Robredo, A., Pérez-López, U., Sainz de la Maza, H., González-Moro, B., Lacuesta, M., Mena-Petite, A., Muñoz-Rueda, A., 2007. Elevated CO₂ alleviates the impact of drought on barley improving water status by lowering stomatal conductance and delaying its effects on photosynthesis. *Environ. Exp. Bot.* 59, 252-263.
- Rogers, A., Fischer, B.U., Bryant, J., Frehner, M., Blum, H., Raines, C.A., Long, S.P., 1998. Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ under low-nitrogen nutrition is affected by the capacity for assimilate utilization. *Perennial ryegrass under free-air CO₂ enrichment.* *Plant Physiol.* 118, 683-689.
- Rogers, H.H., Cure, J.D., Thomas, J.F., Smith, J.M., 1984. Influence of elevated CO₂ on growth of soybean plants. *Crop Sci.* 24, 361-366.
- Rozema, J., 1993. Plant responses to atmospheric carbon dioxide enrichment: interactions with some soil and atmospheric conditions. *Vegetatio* 104-105, 173-190.

Referencias bibliográficas

- Sadras, V.O., Villalobos, F.J., Fereres, E., Wolfe, D.W., 1993. Leaf responses to soil water deficits: Comparative sensitivity of leaf expansion rate and leaf conductance in field-grown sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Soil* 153, 189-194.
- Sæbø, A., Mortensen, L.M., 1995. Growth and regrowth of *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Trifolium repens* and *Trifolium pratense* at normal and elevated CO₂ concentration. *Agric. Ecosyst. Environ.* 55, 29-35.
- Sage, R.F., 1994. Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO₂: The gas exchange perspective. *Photosynthesis Res.* 39, 351-368.
- Saito, I., Matsuura, T., Inoue, K., 1981. Formation of superoxide ion from singlet oxygen. Use of a water-soluble singlet oxygen source. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 188-190.
- Saito, T., Terashima, I., 2004. Reversible decreases in the bulk elastic modulus of mature leaves of deciduous *Quercus* species subjected to two drought treatments. *Plant Cell Environ.* 27, 863-875.
- Sala, O.E., Stuart Chapin, F., III, Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H.A., Oesterheld, M.n., Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M., Wall, D.H., 2000. Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. *Science* 287, 1770-1774.
- Samarakoon, A.B., Gifford, R.M., 1995. Soil water content under plants at high CO₂ concentration and interactions with the direct CO₂ effects: a species comparison. *J. Biogeogr.* 22, 193-202.
- Sánchez-Blanco, M.J., Morales, M.A., Torrecillas, A., Alarcón, J.J., 1998. Diurnal and seasonal osmotic potential changes in *Lotus creticus* creticus plants grown under saline stress. *Plant Sci.* 136, 1-10.
- Sánchez-Díaz, M., Aguirreolea, J., 2000. El agua en la planta, in: Azcón-Bieto, J., Talón, M. (Eds.), *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, pp 17-30.
- Sánchez, F.J., de Andrés, E.F., Tenorio, J.L., Ayerbe, L., 2004. Growth of epicotyls, turgor maintenance and osmotic adjustment in pea plants (*Pisum sativum* L.) subjected to water stress. *Field Crops Res.* 86, 81-90.
- Sanità di Toppi, L., Marabottini, R., Badiani, M., Raschi, A., 2002. Antioxidant status in herbaceous plants growing under elevated CO₂ in mini-FACE rings. *J. Plant Physiol.* 159, 1005-1013.

- Saxe, H., Ellsworth, D.S., Heath, J., 1998. Tree and forest functioning in an enriched CO₂ atmosphere. *New Phytol.* 139, 395-436.
- Schapendonk, A.H.C.M., van Oijen, M., Dijkstra, P., Pot, C.S., Jordi, W.J.R.M., Stoop, G.M., 2000. Effects of elevated CO₂ concentration on photosynthetic acclimation and productivity of two potato cultivars grown in open-top chambers. *Funct. Plant Biol.* 27, 1119-1130.
- Scholander, P.F., Bradstreet, E.D., Hemmingsen, E.A., Hammel, H.T., 1965. Sap pressure in vascular plants: Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148, 339-346.
- Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M., Waner, D., 2001. Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 627-658.
- Schulte, P.J., 1992. The units of currency for plant water status. *Plant Cell Environ.* 15, 7-10.
- Schwanz, P., Häberle, K.-H., Polle, A., 1996a. Interactive effects of elevated CO₂, ozone and drought stress on the activities of antioxidative enzymes in needles of norway spruce trees (*Picea abies*, [L] Karsten) grown with luxurious N-supply. *J. Plant Physiol.* 148, 351-355.
- Schwanz, P., Kimball, B.A., Idso, S.B., Hendrix, D.L., Polle, A., 1996b. Antioxidants in sun and shade leaves of sour orange trees (*Citrus aurantium*) after long-term acclimation to elevated CO₂. *J. Exp. Bot.* 47, 1941-1950.
- Schwanz, P., Picon, C., Vivin, P., Dreyer, E., Guehl, J.M., Polle, A., 1996c. Responses of antioxidative systems to drought stress in pendunculate oak and maritime pine as modulated by elevated CO₂. *Plant Physiol.* 110, 393-402.
- Schwanz, P., Polle, A., 2001. Differential stress responses of antioxidative systems to drought in pendunculate oak (*Quercus robur*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) grown under high CO₂ concentrations. *J. Exp. Bot.* 52, 133-143.
- Schwartz, A., Ilan, N., Grantz, D.A., 1988. Calcium effects on stomatal movement in *Commelina communis* L. : Use of EGTA to modulate stomatal response to light, KCl and CO₂. *Plant Physiol.* 87, 583-587.
- Schwinning, S., Parsons, A.J., 1996. Analysis of the coexistence mechanisms for grasses and legumes in grazing systems. *J. Ecol.* 84, 799-813.
- Scurlock, J.M.O., Hall, D.O., 1998. The global carbon sink: a grassland perspective. *Glob. Chang. Biol.* 4, 229-233.

Referencias bibliográficas

- Serraj, R., Sinclair, T.R., 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant Cell Environ.* 25, 333-341.
- Sgherri, C., Pérez-López, U., 2013. Glutathione/ascorbate cycle and its interrelation with lipoic acid: could it explain why plants do not get cancer, in: Labrou, N., Fliemetakakis, E. (Eds.), *Glutathione: Biochemistry, Mechanisms of Action and Biotechnological Implications*. Nova Biomedical, New York, pp 233-262.
- Sharkey, T., Savitch, L., Butz, N., 1991. Photometric method for routine determination of k_{cat} and carbamylation of rubisco. *Photosynthesis Res.* 28, 41-48.
- Sheaffer, C.C., Peterson, P.R., Hall, M.H., Stordahl, J.B., 1992. Drought effects on yield and quality of perennial grasses in the north central United States. *J. Prod. Agric.* 5, 556-561.
- Signarbieux, C., Feller, U., 2011. Non-stomatal limitations of photosynthesis in grassland species under artificial drought in the field. *Environ. Exp. Bot.* 71, 192-197.
- Silva, E.N., Ferreira-Silva, S.L., Viégas, R.A., Silveira, J.A.G., 2010. The role of organic and inorganic solutes in the osmotic adjustment of drought-stressed *Jatropha curcas* plants. *Environ. Exp. Bot.* 69, 279-285.
- Smirnoff, N., 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 229-235.
- Smirnoff, N., Colombé, S.V., 1988. Drought influences the activity of enzymes of the chloroplast hydrogen peroxide scavenging system. *J. Exp. Bot.* 39, 1097-1108.
- Smith, D.M., Roberts, J.M., 2003. Hydraulic conductivities of competing root systems of *Grevillea robusta* and maize in agroforestry. *Plant Soil* 251, 343-349.
- Smith, S.J., Thomson, A.M., Rosenberg, N.J., Izaurralde, R.C., Brown, R.A., Wigley, T.M.L., 2005. Climate change impacts for the conterminous USA: An integrated assessment. Part 1. Scenarios and context, in: Rosenberg, N., Edmonds, J. (Eds.), *Climate change impacts for the conterminous USA*. Springer Netherlands, pp 7-25.
- Soussana, J.F., Lüscher, A., 2007. Temperate grasslands and global atmospheric change: a review. *Grass Forage Sci.* 62, 127-134.
- Stanton, K.M., Mickelbart, M.V., 2014. Maintenance of water uptake and reduced water loss contribute to water stress tolerance of *Spiraea alba* Du Roi and *Spiraea tomentosa* L. *Horticulture Research* 1, 14033.

- Stedle, E., Henzler, T., 1995. Water channels in plants: do basic concepts of water transport change? *J. Exp. Bot.* 46, 1067-1076.
- Stitt, M., Krapp, A., 1999. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell Environ.* 22, 583-621.
- Stocker, B.D., Strassmann, K., Joos, F., 2011. Sensitivity of Holocene atmospheric CO₂ and the modern carbon budget to early human land use: analyses with a process-based model. *Biogeosciences* 8, 69-88.
- Stulen, I., den Hertog, J., 1993. Root growth and functioning under atmospheric CO₂ enrichment. *Vegetatio* 104-105, 99-115.
- Suriyagoda, L., Ryan, M., Renton, M., Lambers, H., 2011. Above- and below-ground interactions of grass and pasture legume species when grown together under drought and low phosphorus availability. *Plant Soil* 348, 281-297.
- Taiz, L., 1984. Plant cell expansion: Regulation of cell wall mechanical properties. *Annual Review of Plant Physiology* 35, 585-657.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2010. *Plant Physiology*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Tanguilig, V.C., Yambao, E.B., O'toole, J.C., De Datta, S.K., 1987. Water stress effects on leaf elongation, leaf water potential, transpiration, and nutrient uptake of rice, maize, and soybean. *Plant Soil* 103, 155-168.
- Tattini, M., Montagni, G., Traversi, M.L., 2002. Gas exchange, water relations and osmotic adjustment in *Phillyrea latifolia* grown at various salinity concentrations. *Tree Physiol.* 22, 403-412.
- Taub, D.R., Miller, B., Allen, H., 2008. Effects of elevated CO₂ on the protein concentration of food crops: a meta-analysis. *Glob. Chang. Biol.* 14, 565-575.
- Tausz, M., Širčelj, H., Grill, D., 2004. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *J. Exp. Bot.* 55, 1955-1962.
- Temperton, V.M., Grayston, S.J., Jackson, G., Barton, C.V.M., Millard, P., Jarvis, P.G., 2003. Effects of elevated carbon dioxide concentration on growth and nitrogen fixation in *Alnus glutinosa* in a long-term field experiment. *Tree Physiol.* 23, 1051-1059.
- Teyssonneyre, F., Picon-Cochard, C., Falcimagne, R., Soussana, J.-F., 2002. Effects of elevated CO₂ and cutting frequency on plant community structure in a temperate grassland. *Glob. Chang. Biol.* 8, 1034-1046.

Referencias bibliográficas

- Tezara, W., Driscoll, S., Lawlor, D.W., 2008. Partitioning of photosynthetic electron flow between CO₂ assimilation and O₂ reduction in sunflower plants under water deficit. *Photosynthetica* 46, 127-134.
- Tezara, W., Mitchell, V.J., Driscoll, S.D., Lawlor, D.W., 1999. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* 401, 914-917.
- Thomas, S.C., Bazzaz, F.A., 1993. The Genetic Component in Plant Size Hierarchies: Norms of Reaction to Density in a *Polygonum* Species. *Ecol. Monogr.* 63, 231-249.
- Tognetti, R., Longobucco, A., Miglietta, F., Raschi, A., 1998. Transpiration and stomatal behaviour of *Quercus ilex* plants during the summer in a Mediterranean carbon dioxide spring. *Plant Cell Environ.* 21, 613-622.
- Tognetti, R., Minnocci, A., Peñuelas, J., Raschi, A., Jones, M.B., 2000. Comparative field water relations of three Mediterranean shrub species co-occurring at a natural CO₂ vent. *J. Exp. Bot.* 51, 1135-1146.
- Touchette, B., Iannaccone, L., Turner, G., Frank, A., 2007. Drought tolerance versus drought avoidance: A comparison of plant-water relations in herbaceous wetland plants subjected to water withdrawal and repletion. *Wetlands* 27, 656-667.
- Triantaphylidès, C., Havaux, M., 2009. Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci.* 14, 219-228.
- Tricker, P.J., Pecchiari, M., Bunn, S.M., Vaccari, F.P., Peressotti, A., Miglietta, F., Taylor, G., 2009. Water use of a bioenergy plantation increases in a future high CO₂ world. *Biomass Bioener.* 33, 200-208.
- Tschaplinski, T.J., Norby, R.J., Wullschleger, S.D., 1993. Responses of loblolly pine seedlings to elevated CO₂ and fluctuating water supply. *Tree Physiol.* 13, 283-296.
- Tschaplinski, T.J., Stewart, D.B., Hanson, P.J., Norby, R.J., 1995a. Interactions between drought and elevated CO₂ on growth and gas exchange of seedlings of three deciduous tree species. *New Phytol.* 129, 63-71.
- Tschaplinski, T.J., Stewart, D.B., Norby, R.J., 1995b. Interactions between drought and elevated CO₂ on osmotic adjustment and solute concentrations of tree seedlings. *New Phytol.* 131, 169-177.
- Tyree, M.T., Sperry, J.S., 1989. Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 19-36.

- Usuda, H., 2006. Effects of elevated CO₂ on the capacity for photosynthesis of a single leaf and a whole plant, and on growth in a radish. *Plant Cell Physiol.* 47, 262-269.
- van der Werf, A., Nagel, O., 1996. Carbon allocation to shoots and roots in relation to nitrogen supply is mediated by cytokinins and sucrose: Opinion. *Plant Soil* 185, 21-32.
- Van der Werf, A., Nuenen, M., Visser, A., Lambers, H., 1993. Contribution of physiological and morphological plant traits to a species' competitive ability at high and low nitrogen supply. *Oecologia* 94, 434-440.
- Van Soest, P.J., 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Vassey, T.L., Sharkey, T.D., 1989. Mild water stress of *Phaseolus vulgaris* plants leads to reduced starch synthesis and extractable sucrose phosphate synthase activity. *Plant Physiol.* 89, 1066-1070.
- Verlinden, M., Kerkhove, A., Nijs, I., 2013. Effects of experimental climate warming and associated soil drought on the competition between three highly invasive West European alien plant species and native counterparts. *Plant Ecol.* 214, 243-254.
- Vernoux, T., Wilson, R.C., Seeley, K.A., Reichheld, J.-P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, S.C., Cobbett, C.S., Van Montagu, M., Inzé, D., May, M.J., Sung, Z.R., 2000. The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* 12, 97-109.
- Villar-Salvador, P., Planelles, R., Oliet, J., Peñuelas-Rubira, J.L., Jacobs, D.F., González, M., 2004. Drought tolerance and transplanting performance of holm oak (*Quercus ilex*) seedlings after drought hardening in the nursery. *Tree Physiol.* 24, 1147-1155.
- Volk, M., Niklaus, P.A., Körner, C., 2000. Soil moisture effects determine CO₂ responses of grassland species. *Oecologia* 125, 380-388.
- von Caemmerer, S., Farquhar, G.D., 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153, 376-387.
- von Caemmerer, S., Ghannoum, O., Conroy, J.P., Clark, H., Newton, P.C.D., 2001. Photosynthetic responses of temperate species to free air CO₂ enrichment (FACE) in a grazed New Zealand pasture. *Funct. Plant Biol.* 28, 439-450.

- Vu, J.C.V., Allen Jr, L.H., 2009. Growth at elevated CO₂ delays the adverse effects of drought stress on leaf photosynthesis of the C₄ sugarcane. *J. Plant Physiol.* 166, 107-116.
- Vu, J.C.V., Gesch, R.W., Hartwell Allen Jr, L., Boote, K.J., Bowes, G., 1999. CO₂ enrichment delays a rapid, drought-induced decrease in rubisco small subunit transcript abundance. *J. Plant Physiol.* 155, 139-142.
- Wall, G.W., Garcia, R.L., Kimball, B.A., Hunsaker, D.J., Pinter, P.J., Long, S.P., Osborne, C.P., Hendrix, D.L., Wechsung, F., Wechsung, G., Leavitt, S.W., LaMorte, R.L., Idso, S.B., 2006. Interactive effects of elevated carbon dioxide and drought on wheat. *Agron. J.* 98, 354-381.
- Wall, G.W., Garcia, R.L., Wechsung, F., Kimball, B.A., 2011. Elevated atmospheric CO₂ and drought effects on leaf gas exchange properties of barley. *Agric. Ecosyst. Environ.* 144, 390-404.
- Wand, S.J.E., Midgley, G.F., Jones, M.H., Curtis, P.S., 1999. Responses of wild C₄ and C₃ grass (Poaceae) species to elevated atmospheric CO₂ concentration: a meta-analytic test of current theories and perceptions. *Glob. Chang. Biol.* 5, 723-741.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A., 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, 1-14.
- Wang, X., 2007. Effects of species richness and elevated carbon dioxide on biomass accumulation: a synthesis using meta-analysis. *Oecologia* 152, 595-605.
- Wang, X., Lewis, J.D., Tissue, D.T., Seemann, J.R., Griffin, K.L., 2001. Effects of elevated atmospheric CO₂ concentration on leaf dark respiration of *Xanthium strumarium* in light and in darkness. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2479-2484.
- Warwick, K.R., Taylor, G., Blum, H., 1998. Biomass and compositional changes occur in chalk grassland turves exposed to elevated CO₂ for two seasons in FACE. *Glob. Chang. Biol.* 4, 375-385.
- Wayne, P.M., Bazzaz, F.A., 1995. Seedling density modifies the growth responses of yellow birch maternal families to elevated carbon dioxide. *Glob. Chang. Biol.* 1, 315-324.
- Webb, A.A.R., McAinsh, M.R., Mansfield, T.A., Hetherington, A.M., 1996. Carbon dioxide induces increases in guard cell cytosolic free calcium. *Plant J.* 9, 297-304.
- Wellburn, A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144, 307-313.

- Wheeler, G.L., Jones, M.A., Smirnoff, N., 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393, 365-369.
- White, D.A., Turner, N.C., Galbraith, J.H., 2000. Leaf water relations and stomatal behavior of four allopatric *Eucalyptus* species planted in Mediterranean southwestern Australia. *Tree Physiol.* 20, 1157-1165.
- Willekens, H., Inzé, D., Van Montagu, M., Camp, W., 1995. Catalases in plants. *Mol. Breed.* 1, 207-228.
- Wolfe, D.W., Gifford, R.M., Hilbert, D., Luo, Y., 1998. Integration of photosynthetic acclimation to CO₂ at the whole-plant level. *Glob. Chang. Biol.* 4, 879-893.
- Wullschleger, S.D., Tschaplinski, T.J., Norby, R.J., 2002. Plant water relations at elevated CO₂— implications for water-limited environments. *Plant Cell Environ.* 25, 319-331.
- Wyn Jones, R.G., Gorham, J., 1983. Osmoregulation, in: Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., Ziegler, H. (Eds.), *Physiological Plant Ecology III. Responses to the chemical and biological environment.* Springer Berlin Heidelberg, pp 35-58.
- Young, J.J., Mehta, S., Israelsson, M., Godoski, J., Grill, E., Schroeder, J.I., 2006. CO₂ signaling in guard cells: Calcium sensitivity response modulation, a Ca²⁺-independent phase, and CO₂ insensitivity of the *gca2* mutant. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 7506-7511.
- Zeiger, E., Talbott, L.D., Frechilla, S., Srivastava, A., Zhu, J., 2002. The guard cell chloroplast: a perspective for the twenty-first century. *New Phytol.* 153, 415-424.
- Zhang, J., Cheng, G., Yu, F., Kräuchi, N., Li, M.-H., 2008. Intensity and importance of competition for a grass (*Festuca rubra*) and a legume (*Trifolium pratense*) vary with environmental changes. *J. Integr. Plant Biol.* 50, 1570-1579.
- Zhang, J., Cheng, G., Yu, F., Kräuchi, N., Li, M.-H., 2009. Interspecific variations in responses of *Festuca rubra* and *Trifolium pratense* to a severe clipping under environmental changes. *Biologia* 64, 292-298.
- Zhang, J.X., Kirkham, M.B., 1994. Drought-stress-induced changes in activities of superoxide-dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol.* 35, 785-791.

El uso de combustibles fósiles junto con la deforestación y otras causas antropogénicas están provocando un incremento de los gases de efecto invernadero, teniendo como consecuencia final el cambio climático. Además de un aumento de la concentración atmosférica de CO₂, se prevé que se incrementen los periodos de sequía.

Debido a la importancia como alimento para el ganado de los ecosistemas de praderas, y para dilucidar los efectos de estos factores ambientales en dicho ecosistema, se ha estudiado la respuesta fisiológica de varias especies pratenses (leguminosas y gramíneas), analizando las relaciones hídricas, el metabolismo fotosintético, el metabolismo antioxidante, el crecimiento y la calidad forrajera de las mismas. Además, se ha investigado si el tipo de competencia (intra- e interespecífica) al que son sometidas las plantas altera dicha respuesta.

El elevado CO₂ aumentó el crecimiento de ambos grupos funcionales gracias a unas mayores tasas de asimilación de CO₂ debido a la mayor disponibilidad de éste en los cloroplastos. Sin embargo, redujo la calidad forrajera al aumentar la relación C/N de *Trifolium pratense*.

La sequía redujo el contenido de agua de las plantas, a la vez que provocó un descenso en la turgencia y un cierre estomático. Esto desencadenó que las plantas dispusieran de una menor concentración de CO₂ en los cloroplastos lo que redujo la tasa de asimilación de CO₂ y, en último término, el crecimiento.

El elevado CO₂ mitigó parcialmente el efecto negativo de la sequía en el crecimiento de las especies estudiadas, al presentar las plantas un mayor potencial de pared que a CO₂ ambiental, gracias a un mayor ajuste osmótico en el caso de *Trifolium pratense* y, en el caso de *Agrostis capillaris*, por una menor reducción del potencial hídrico. Además, gracias a la mayor disponibilidad de CO₂ en los cloroplastos, la tasa de asimilación fue mayor que cuando la sequía se imponía a CO₂ ambiental. Ambos factores permitieron a las plantas un mayor crecimiento.

El crecimiento en cultivo mixto redujo el crecimiento de las gramíneas debido, por un lado, a una menor capacidad de interceptar luz por la morfología y mayor tamaño de las hojas de las leguminosas y, por otro lado, a una menor capacidad de captar agua y nutrientes minerales por un sistema radical menos desarrollado y unos valores de conductancia hidráulica inferiores.

Estos resultados confirman parte de las hipótesis planteadas inicialmente de que el elevado CO₂ y la sequía tendrían efectos antagónicos y que se observarían diferencias entre los grupos funcionales, y que tales efectos variarían además en función del tipo de competencia. En último término, la respuesta fisiológica de las especies pratenses frente al elevado CO₂ y la sequía, derivados del cambio climático, será dependiente del tipo de competencia al que estén sometidas.