



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Arundo donax L. como gramínea perenne para la producción de biomasa en ambiente Mediterráneo

Gladys Liliana Lino Villanueva

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

***Arundo donax* L. como gramínea perenne para la producción de biomasa en ambiente Mediterráneo**

Memoria presentada por Gladys Liliana Lino Villanueva para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona. Este trabajo se enmarca dentro del programa de doctorado de “Biología Vegetal” correspondiente al bienio 2012/2016 del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona bajo la dirección del Dr. Salvador Nogués Mestres.

Doctoranda

Gladys Liliana Lino Villanueva

Director de Tesis

Salvador Nogués Mestres

Barcelona, 15 de abril de 2016



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

*“Y una vez que la tormenta termine,
no recordarás cómo lo lograste, cómo sobreviviste.
Ni siquiera estarás seguro si la tormenta ha terminado
realmente.
Pero una cosa si es segura,
Cuando salgas de esa tormenta,
no serás la misma persona que entró en ella”*

Kafka en la orilla
Haruki Murakami

AGRADECIMIENTOS

A l' Dr. Salvador Nogués (perdona pel català nivell bàsic), t'estic molt agraïda des del dia que em vas donar l'oportunitat de treballar en el teu grup de recerca i per animar-me a continuar malgrat les dificultats i les distàncies. Moltes gràcies per tot el que he après en aquests anys.

A los compañeros del grupo de investigación: Salva, Carla, Alba, Xavi, Camilo y Fernando, por su ayuda en temas técnicos y por los momentos compartidos. Un agradecimiento especial a Claudia y Elena, por su amistad y por la ayuda al leer y releer esta tesis ¡Muchísimas gracias!

A los profesores de la Unidad de Fisiología Vegetal, por estar siempre dispuestos a ayudar en cualquier momento. Un agradecimiento especial al grupo de investigación del Dr. José Luis Araus por la ayuda en el transporte intercontinental de muestras. A los compañeros de la Unidad, Marta Renato, Jordi Fernández, Sean Meehan, Marta Pintó, Ruth Sánchez y Bang Wei.

A los miembros del proyecto OPTIMA (*Optimization of Perennial Grasses for Biomass Production in Mediterranean Area*) por las enriquecedoras reuniones de equipo. In particular to the Chinese team. Thank you Dr. Jianbing Yan and Xin Luo! For receiving me at home the time I was in China and for teaching me your work in GBS. 谢谢.

A Ricardo Simonneau, Josep Matas y Xavier García de los Servicios de Campos Experimentales. Muchas gracias por el soporte en el invernadero y campo y, por los buenos consejos al realizar los experimentos.

A Pilar Teixidor y sobre todo a Pilar Rubio de los Servicios Científico Técnico, por el apoyo brindado con los isótopos.

A Manel Bosch, por la asistencia técnica en la parte de microscopía y por la extensión del Fiji para hacer más fácil el conteo de cromosomas. ¡Muchas gracias por eso!

A Esther Carbó, Marga Montejo y Carmen Cañueto, gracias por la ayuda práctica y logística.

A mis amigas de toda la vida: Solange, Silvinia, Sumy y Karin por todos los ánimos brindados y por haber tenido que soportar los “no puedo, tengo que trabajar en la tesis”. ¡Muchas gracias chicas! A Willy, por la amistad de hace varios años y por estar pendiente de este proceso desde que se inició ¡Gracias flaco!

A mis compañeras del máster: Ingrith, Cris y Maye, aunque el destino nos haya llevado por caminos distintos, siempre ocupan un lugar en mi corazón. Por los

momentos buenos y los malos que nos tocó vivir lejos de casa. ¡Espero verlas pronto!

A mis amigos de la Universidad Científica del Sur: Alfonso, Yanina, Mauri, Eka, Roxi, Jorge y Javier, porque es un placer trabajar con ustedes. ¡Suerte la mía de haberlos conocido! Gracias por los ánimos, sobre todo los últimos días en los que me he encontrado muy cansada física y mentalmente. Espero que la vida los recompense por ser tan buenas personas.

A mis padres y hermanos, porque a pesar de mis malos días, siempre han estado pendientes de mí, por acompañarme en este camino y porque cada día me enseñan que con trabajo, esfuerzo y ganas, todo se puede lograr.

A Paolo, por ser la luz que nos ilumina en nuestros días más oscuros.

A José, por ser mi soporte emocional, por tus palabras y tu positividad, porque ves la vida de una manera distinta a como yo la percibo, por tu comprensión al pensar que esto debía ser primero, por los sábados de tesis, por liberarme de tareas mecánicas como la corrección de la bibliografía (¡lo siento!) y por tu infinita paciencia conmigo.

INDICE

ÍNDICE

ABREVIACIONES	25
1. INTRODUCCIÓN	31
1.1. El cambio climático	33
1.2. La bioenergía.....	34
1.3. La biomasa	36
1.4. Los biocombustibles.....	37
1.5. Las gramíneas perennes como fuente de biomasa	39
1.6. <i>Arundo donax</i> L.	40
1.7. La biotecnología aplicada a <i>Arundo donax</i> L.....	43
1.8. Conceptos básicos sobre biología molecular	44
1.8.1. <i>Genotyping by sequencing</i>	45
2. OBJETIVOS	47
2.1. Objetivo general.....	49
2.2. Objetivos específicos	49
3. MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.1. Material vegetal	53
3.2. Diseño experimental y condiciones de cultivo	54
3.2.1. Experimento I: Estudio del efecto del riego en plantas de <i>Arundo donax</i> L. en condiciones de campo	54
3.2.2. Experimento II: Estudio del efecto del estrés hídrico en plantas de <i>Arundo donax</i> L. en condiciones de invernadero	57
3.2.3. Experimento III: Estudio molecular de cinco ecotipos de <i>Arundo donax</i> L.....	58
3.3. Metodología.....	59
3.3.1. Medidas de crecimiento	59
3.3.1.1. Altura del tallo (Experimento I y II)	59
3.3.1.2. Peso fresco y peso seco (Experimento II y III).....	59
3.3.1.3. Área foliar (Experimento II y III)	60
3.3.1.4. Relaciones entre fracciones (Experimento II)	60
3.3.2. Caracterizaciones fisiológicas	61
3.3.2.1. Intercambio de gases (Experimento I y II)	61
3.3.2.1.1. Curvas de respuesta al CO ₂ (Experimento I y II).....	61
3.3.2.1.2. Curvas de respuesta a la luz (Experimento I).....	62
3.3.2.2. Fluorescencia modulada de clorofilas (Experimento I y II)	62
3.3.2.3. Contenido de clorofilas (Experimento I, II y III).....	63

3.3.2.4.	Eficiencia en el uso del agua (Experimento I y II)	63
3.3.2.5.	Contenido hídrico relativo (Experimento I y II)	64
3.3.3.	Análisis de la composición isotópica (Experimento II)	64
3.3.3.1.	Procedimiento de marcaje isotópico con ¹³ C	64
3.3.3.2.	Medidas isotópicas y análisis elemental	65
3.3.3.3.	Determinación de la composición isotópica de ¹³ C del CO ₂ en el aire	66
3.3.3.4.	Determinación de la composición isotópica de ¹³ C en la materia orgánica total	67
3.3.3.4.1.	Obtención de muestras	68
3.3.3.5.	Análisis de las muestras	68
3.3.4.	Determinaciones bioquímicas (Experimento II)	69
3.3.4.1.	Extracción de azúcares solubles (Experimento II)	69
3.3.4.2.	Extracción de almidón (Experimento II)	70
3.3.5.	Análisis moleculares	71
3.3.5.1.	Extracción de ADN genómico	71
3.3.5.2.	Técnicas básicas para el análisis de ADN	73
3.3.5.2.1.	Fluorimetría	73
3.3.5.2.2.	Electroforesis en geles de agarosa	74
3.3.5.2.3.	Reacción en cadena de la polimerasa	76
3.3.5.3.	Protocolo para el <i>Genotyping by Sequencing</i> (GBS)	78
3.3.5.3.1.	Enzima de restricción (RE)	78
3.3.5.3.2.	Cebadores	78
3.3.5.3.3.	Adaptadores	79
3.3.5.3.4.	Construcción de librerías <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS)	81
3.3.5.3.5.	<i>Tags</i> y <i>Filtering raw sequence data</i>	82
3.3.5.3.6.	Alineamiento de secuencias de ADN	84
3.3.5.3.7.	<i>Network filter</i>	84
3.3.5.4.	Construcción de árboles filogenéticos	85
3.3.5.5.	Conteo de cromosomas	85
3.3.6.	Análisis estadístico	86
4.	RESULTADOS	89
4.1.	Experimento I: Estudio del efecto del riego en plantas de <i>Arundo donax</i> L. en condiciones de campo	91
4.1.1.	Medidas de crecimiento	91
4.1.2.	Caracterizaciones fisiológicas	92
4.1.2.1.	Intercambio de gases	92

4.1.2.2.	Fluorescencia modulada de clorofilas.....	95
4.1.2.3.	Contenido de clorofilas	96
4.1.2.4.	Eficiencia en el uso del agua	97
4.1.2.5.	Contenido hídrico relativo	97
4.1.3.	Análisis moleculares.....	98
4.2.	Experimento II: Estudio del efecto del estrés hídrico en plantas de <i>Arundo donax</i> L. en condiciones de invernadero	103
4.2.1.	Medidas de crecimiento y parámetros de biomasa	103
4.2.2.	Caracterizaciones fisiológicas	106
4.2.2.1.	Intercambio de gases	106
4.2.2.2.	Fluorescencia modulada de clorofilas.....	108
4.2.2.3.	Contenido de clorofilas	108
4.2.2.4.	Eficiencia en el uso del agua	108
4.2.2.5.	Contenido hídrico relativo	109
4.2.3.	Análisis isotópico.....	109
4.2.3.1.	Composición isotópica de ¹³ C del CO ₂ respirado en oscuridad (R)	109
4.2.3.2.	Composición isotópica de ¹³ C en la materia orgánica total (MOT).....	110
4.2.3.3.	Composición isotópica de ¹³ C en los azúcares solubles totales (AST).....	111
4.2.3.4.	Composición isotópica de ¹³ C en el almidón (ALM)	112
4.3.	Experimento III: Estudio molecular de cinco ecotipos de <i>Arundo donax</i> L.....	114
4.3.1.	Medidas de crecimiento	114
4.3.2.	Contenido de clorofilas	115
4.3.3.	Conteo de cromosomas	115
4.3.4.	Análisis molecular	116
4.3.4.1.	Extracción de ADN, pruebas de calidad y PCR	116
5.	DISCUSIÓN	123
5.1.	Experimento I: Estudio del efecto del riego en plantas de <i>Arundo donax</i> L. en condiciones de campo	125
5.1.1.	Medidas de crecimiento	125
5.1.2.	Caracterizaciones fisiológicas	126
5.1.3.	Análisis moleculares.....	127
5.2.	Experimento II: Estudio del efecto del estrés hídrico en plantas de <i>Arundo donax</i> L. en condiciones de invernadero	130
5.2.1.	Medidas de crecimiento	130
5.2.2.	Caracterizaciones fisiológicas	131
5.2.3.	Análisis isotópico.....	132

5.3.	Experimento III: Estudio molecular de cinco ecotipos de <i>Arundo donax</i> L.....	136
5.3.1.	Medidas de crecimiento.....	136
5.3.2.	Análisis moleculares.....	136
5.3.3.	Conteo de cromosomas	138
6.	CONCLUSIONES	141
6.1.	Experimento I.....	143
6.2.	Experimento II.....	143
6.3.	Experimento III.....	144
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
8.	ANEXOS	159
8.1.	Experimento I.....	161
8.2.	Experimento II.....	162
8.3.	Experimento III.....	163

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Evolución de la cantidad de CO ₂ en la atmósfera desde 1700 hasta la actualidad. Las lecturas de antes de 1960 fueron analizadas a partir de burbujas de aire atrapadas en hielo. Las lecturas después de 1960 fueron analizadas a partir de muestras de aire del observatorio de Mauna Loa (Hawái; Keeling <i>et al.</i> , 2001).....	33
Figura 1.2. Hipótesis sobre el origen filogenético de <i>A. donax</i> asumiendo un número de cromosomas de 110 (Bucci <i>et al.</i> , 2013).....	42
Figura 3.1. Esquema del diseño del Experimento I.	55
Figura 3.2. Esquema del diseño del Experimento II.	58
Figura 3.3. Esquema del diseño del Experimento III.	59
Figura 3.4. Peso de la materia seca evaluada en los experimentos.	60
Figura 3.5. A) Equipo para extracción de ADNg (Thermo Scientific KingFisher) del laboratorio National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement - Huazhong Agricultural University. B-C) Placas especiales para la extracción de ADN.	72
Figura 3.6. Fluorómetro Qubit® 2.0 del laboratorio <i>National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement - Huazhong Agricultural University</i>	73
Figura 3.7. Termociclador T100™ Thermal Cycler, BIORAD.....	77
Figura 3.8. Posición de las secuencias de doble cadena del adaptador de código de barras y el adaptador común, en relación al ADN inserto (Elshire <i>et al.</i> , 2011).....	79
Figura 3.9. (A) Múltiples muestras de ADN se digirieron y se secuenciaron usando GBS (las flechas rojas representan los sitios de corte). Todas las lecturas son computacionalmente recortadas a 100 pb. Las líneas de colores sólidos representan lecturas libre de errores ("reales"), mientras que las líneas discontinuas son lecturas que contienen uno o más errores de secuenciación. (B) Las lecturas idénticas se clasifican como un <i>tag</i> . Las barras de colores son etiquetas reales, mientras que la barra sombreada es una etiqueta de error. (C) La alineación de pares de <i>tags</i> se realizan para encontrar pares de <i>tags</i> que difieren en sólo un único pb. (D) Topología de las redes de <i>tags</i> . Los círculos de colores son etiquetas reales, mientras que los círculos sombreados son etiquetas de error. Líneas (bordes) se dibujan solamente entre etiquetas que difieren por un solo desajuste de pb. (E) Sólo líneas recíprocas entre pares de <i>tags</i> reales se mantienen como SNPs (Lu <i>et al.</i> , 2013).	83
Figura 3.10. (A) Raíces de <i>A. donax</i> después de lavarlas con agua corriente. (B) Puntas de raíces cortadas para iniciar el protocolo para el conteo de cromosomas.....	86
Figura 4.1. Tasa de asimilación neta de CO ₂ a saturación de luz (A_{sat}) en T ₀ (primavera) y T ₁ (principio de verano). Los valores representan la media \pm SE de tres réplicas (n=3). R (tratamiento de regadío), S (tratamiento de secano). Letras mayúsculas indican diferencias significativas (P<0.05) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras	

minúsculas diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.....	92
Figura 4.2. Tasa de fotosíntesis neta máxima (A_{max}) en T_0 (primavera) y T_1 (principio de verano). Los valores representan la media \pm SE de tres réplicas ($n=3$). R (tratamiento de regadío), S (tratamiento de secano). Letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.	93
Figura 4.3. Conductancia estomática (g_s) en T_0 (primavera) y T_1 (principio de verano). Los valores representan la media \pm SE de tres réplicas ($n=3$). R (tratamiento de regadío), S (tratamiento de secano). Letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.	93
Figura 4.4. Velocidad de carboxilación ($V_{c,max}$) en T_0 (primavera) y T_1 (principio de verano). Los valores representan la media \pm SE de tres réplicas ($n=3$). R (tratamiento de regadío), S (tratamiento de secano). Letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.	94
Figura 4.5. Tasa de transporte de electrones (J_{max}) en T_0 (primavera) y T_1 (principio de verano). Los valores representan la media \pm SE de tres réplicas ($n=3$). R (tratamiento de regadío), S (tratamiento de secano). Letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.	95
Figura 4.6. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % para verificar la calidad de ADNg de <i>A. donax</i> (R: Regadío, S: Secano, MP: Marcador de peso molecular).	98
Figura 4.7. (A) Distribución de la frecuencia de los alelos de 319,900 marcadores SNP. (B) Distribución de las etiquetas en 50 clones del Experimento I.	100
Figura 4.8. Árbol construido a partir de 50 muestras (25 R y 25 S) con 319,900 marcadores SNP.	102
Figura 4.9. Variación en la altura durante los tiempos inicial (T_i) y final (T_f) de <i>A. donax</i> Control (C, 100 % CM), sequía moderada (SM, 50 % CM) y sequía severa (SS, 25 % CM). Los valores representan la media \pm SE de nueve réplicas ($n=9$). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.	103
Figura 4.10. Conteo de cromosomas de <i>A. donax</i> usando el programa Fiji (Image J, Wisconsin, Estados Unidos), obtenido a partir de raíces de cultivo semihidropónico (se muestran los resultados en metafase). (A) Piccoplant, (B) Fondachello, (C) Martinensis, (D) Argentum, (E) Granadensis. Aumento: 1000X.	115
Figura 4.11. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % para verificar la calidad de ADNg de <i>A. donax</i> (P: Piccoplant, G: Granadensis, M: Martinensis, F: Fondachello, MP: Marcador de peso molecular).	117

Figura 4.12. (A) Distribución de la frecuencia de los alelos de 864,213 marcadores SNP.
(B) Distribución de las etiquetas de las 131 muestras del Experimento III. 119

Figura 4.13. Análisis filogenético de 131 muestras de los 5 ecotipos de *A. donax* utilizando los datos de los marcadores generados por GBS. Los diferentes colores representan cada ecotipo. 120

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Clasificación de <i>A. donax</i> L., según el <i>European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute</i> (EBI,2014).....	41
Tabla 3.1. Resumen del diseño experimental: Experimento, localización del experimento, condiciones experimentales, ecotipos y análisis realizados.	53
Tabla 3.2. Ecotipos, lugar de origen y tipo (comercial o silvestre) de las plantas de <i>A. donax</i> utilizadas en esta Tesis.	54
Tabla 3.3. Media mensual de los datos de temperatura (°C) y humedad relativa del ambiente (%), aportados por la Estación Meteorológica del Departamento de Astronomía y Meteorología de la Facultad de Física de la UB y datos de precipitación mensual recogidos del pluviómetro, ubicado en el SCE de la Facultad de Biología de la UB, correspondientes al año 2013. Para este experimento se trabajó con los datos que corresponden al período de junio a septiembre, ambos inclusive.....	56
Tabla 3.4. Secuencia de los cebadores empleados en la amplificación de fragmentos de <i>A. donax</i> publicados por Elshire <i>et al.</i> (2011). Se incluye el nombre, la secuencia en sentido 5'→3', el número de nucleótidos (N° nt) y el % de desoxiguanosina-5'-fosfato y desoxitocitocina-5'-fosfato (% GC).	79
Tabla 4.1. Altura (m) de las plantas y peso seco (g) de la parte aérea (PA) de <i>A. donax</i> crecidas en condiciones de regadío (R) y secano (S), medida en diferentes momentos (T ₀ : primavera; T ₁ : principio de verano; T _f : Tiempo final) de 2013. Los valores representan la media ± SE de cuatro réplicas (n=4). Letras mayúsculas indican diferencias significativas (P<0.05) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias (P<0.05) entre tratamientos dentro de un mismo tiempo según el Test de Duncan.....	91
Tabla 4.2. Medida de F_v/F_m de <i>A. donax</i> crecidas en condiciones de riego y secano y tomadas en diferentes momentos (T ₀ : primavera y T ₁ : principio de verano). Los valores representan la media ± SE de tres réplicas (n=3). R (tratamiento de regadío), S (tratamiento de secano). Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias (P<0.05) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.....	96
Tabla 4.3. Contenido de clorofilas (SPAD) en plantas <i>A. donax</i> crecidas en condiciones de regadío y secano. Parámetro medido en diferentes momentos (T ₀ : primavera y T ₁ : principio de verano). Los valores representan la media ± SE de cuatro réplicas (n=4). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas (P<0.05) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias (P<0.05) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.....	96
Tabla 4.4. Eficiencia en el uso del agua ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$) en plantas de <i>A. donax</i> crecidas en condiciones de regadío y secano. Parámetro medido en diferentes momentos (T ₀ : primavera y T ₁ : principio de verano). Los valores representan la media ± SE de cuatro réplicas (n=4). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas (P<0.05) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias (P<0.05) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.....	97

Tabla 4.5. Contenido hídrico relativo (%) en plantas de <i>A. donax</i> crecidas en condiciones de regadío y seco. Parámetro medido en diferentes momentos (T ₀ : primavera y T ₁ : principio de verano). Los valores representan la media ± SE de cuatro réplicas (n=4). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas (P<0.05) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias (P<0.05) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.....	97
Tabla 4.6. GBS <i>raw data</i> de las muestras R y S del Experimento I.	99
Tabla 4.7. Peso fresco y seco (g) de <i>A. donax</i> medidos en los diferentes tiempos (T ₀ , T ₁ y T ₂), tratamientos: Control (C, 100 % CM), sequía moderada (SM, 50 % CM) y sequía severa (SS, 25 % CM) y órganos estudiados (hoja, tallo, raíz y rizoma).....	104
Tabla 4.8. Efecto del estrés en parámetros de biomasa: área foliar (AF), shoot/root (S/R), peso seco total (PST), índice de área de masa foliar (AMF) y Área foliar específica (AFE) en <i>A. donax</i> Los tratamientos evaluados fueron: Control (C, 100 % CM), sequía moderada (SM, 50 % CM) y sequía severa (SS, 25 % CM) al final del experimento (Tf). Los valores representan la media ± SE de nueve réplicas (n=9). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas (P<0.05) entre tratamientos.....	105
Tabla 4.9. Parámetros fotosintéticos medidos en plantas <i>A. donax</i> en tres tratamientos: Control (C, 100 % CM), sequía moderada (SM, 50 % CM) y sequía severa (SS, 25 % CM). Tasa de asimilación neta de CO ₂ a saturación de luz (<i>A_{sat}</i>), tasa de fotosíntesis neta máxima (<i>A_{max}</i>), conductancia estomática (<i>g_s</i>), velocidad de carboxilación de la RuBisCO (<i>V_{c,max}</i>) y tasa de transporte de electrones (<i>J_{max}</i>) al final del experimento (Tf). Los valores representan la media ± SE de tres repeticiones (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05) entre tratamientos.	107
Tabla 4.10. Medida de los parámetros de fluorescencia (<i>F_v/F_m</i> y <i>F_v'/F_m'</i>) en <i>A. donax</i> en tres tratamientos: Control (C, 100 % CM), sequía moderada (SM, 50 % CM) y sequía severa (SS, 25 % CM) al final del experimento (Tf). Los valores representan la media ± SE de tres repeticiones (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05) entre tratamientos.....	108
Tabla 4.11. Eficiencia en el uso del agua (μmol CO ₂ mol H ₂ O ⁻¹) en plantas de <i>A. donax</i> crecidas en tres tratamientos. Control (C, 100 % CM), sequía moderada (SM, 50 % CM) y sequía severa (SS, 25 % CM). Parámetro medido al final del experimento (Tf). Los valores representan la media ± SE de cuatro réplicas (n=4). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas (P<0.05) tratamientos.....	109
Tabla 4.12. Contenido hídrico relativo (%) en plantas de <i>A. donax</i> crecidas en tres tratamientos. Control (C, 100 % CM), sequía moderada (SM, 50 % CM) y sequía severa (SS, 25 % CM). Parámetro medido al final del experimento (Tf). Los valores representan la media ± SE de cuatro réplicas (n=4). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas (P<0.05) tratamientos.....	109
Tabla 4.13. Composición isotópica de ¹³ C (δ ¹³ C, ‰) del CO ₂ respirado en la oscuridad (δ ¹³ C _R , ‰), azúcares solubles totales (δ ¹³ C _{AST} , ‰), almidón (δ ¹³ C _{ALM} , ‰) y materia orgánica total (δ ¹³ C _{MOT} , ‰), en hojas, tallos, raíz y rizoma en <i>A. donax</i> en los tratamientos: Control (C, 100 % CM), sequía moderada (SM, 50 % CM) y sequía severa	

(SS, 25 % CM) antes del marcaje (T0), un día después del marcaje (T1) y siete días después del marcaje (T2). Los valores representan la media \pm SE de tres réplicas (n=3)..113

Tabla 4.14. Peso fresco acumulado (g; suma total de muestras de hojas enviadas por duplicado) y peso fresco (PF) promedio (peso fresco promedio de los tubos enviados); Peso seco (PS) acumulado (g) y peso seco promedio (g) de *A. donax*. Los resultados mostrados indican solo las muestras de hojas enviadas para la extracción de ADNg. El peso seco refiere al resultado obtenido después que las muestras fueron liofilizadas. 114

Tabla 4.15. Número de cromosomas de cada ecotipo empleado. Los valores representan la media \pm SE de cincuenta réplicas (n=50). Medias con la misma letra, no son significativamente diferentes (P<0.05) según el Test de Duncan..... 116

Tabla 4.16. Número de carriles usadas en el trabajo y las combinaciones de las muestras. Piccoplant (P) = 27 muestras; Fondachello (F) = 24 muestras; Granadensis (G) = 9 muestras; Martinensis (M) = 52 muestras y Argentum (A) = 19 muestras..... 117

Tabla 4.17. GBS *raw data* de los cinco ecotipos del Experimento III. 118

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 8.1. Medida de los parámetros de fluorescencia (F_v/F_m y F_v/F_m') en <i>A. donax</i> crecidas en condiciones de riego y secano en diferentes momentos (T_0 : primavera y T_1 : principio de verano). Los valores representan la media \pm SE de tres réplicas (n=3).	161
Anexo 8.2. Parámetros de intercambio de gases (A_{sat} , A_{max} , g_s , $V_{c,max}$ y J_{max}), fluorescencia modulada de las clorofilas (F_v/F_m y F_v/F_m') y eficiencia en el uso del agua (EUA _{intrínseca}) al inicio del experimento (T_i) en <i>A. donax</i> . Los datos muestran la media de tres réplicas (n=3) \pm SE.	162
Anexo 8.3. Contenido de clorofilas (SPAD) en plantas <i>A. donax</i> crecidas en tres tratamientos: Control (C, 100 % CM), sequía moderada (SM, 50 % CM) y sequía severa (SS, 25 % CM). Parámetro medido en dos momentos (T_i : inicial y T_f : final). Los valores representan la media \pm SE de cuatro réplicas (n=4). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas (P<0.05) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias (P<0.05) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.	162
Anexo 8.4. Análisis estadístico de los efectos de estrés hídrico de <i>A. donax</i> , en $\delta^{13}C_R$ (‰), $\delta^{13}C_{AST}$ (‰), $\delta^{13}C_{ALM}$ (‰) y $\delta^{13}C_{MOT}$ (‰).....	162
Anexo 8.5. Contenido de clorofilas (SPAD) en plantas <i>A. donax</i> crecidas en condiciones normales en invernadero. Parámetro medido al inicio y al final del experimento. Los valores representan la media \pm SE de cinco réplicas (n=5). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas (P<0.05) entre tiempos para un mismo ecotipo y letras minúsculas diferencias (P<0.05) entre ecotipos dentro de un mismo momento de medición.	163
Anexo 8.6. Muestras de <i>A. donax</i> por ecotipo (P=Piccoplant; F=Fondachello; M=Martinensis; A=Argentum; G=Granadensis), concentración de ADN después de la electroforesis (Qubit), cantidad de agua para obtener una concentración final de 10 ng / μ l en un volumen final de 40 μ l, posición de cada muestra en la placa de Elisa tanto en filas como en columnas.....	163
Anexo 8.7. Placas de Elisa con el orden en que se colocaron los códigos de barra para las 131 muestras del Experimento III. BC = Código de barras.....	165
Anexo 8.8. Concentración de ADNg obtenido con el Qubit® 2.0 Fluorometer.	165
Anexo 8.9. Árbol filogenético del ecotipo Piccoplant.	166
Anexo 8.10. Árbol filogenético del ecotipo Fondachello.	167
Anexo 8.11. Árbol filogenético del ecotipo Martinensis.	168
Anexo 8.12. Árbol filogenético del ecotipo Argetum.	169
Anexo 8.13. Árbol filogenético del ecotipo Granadensis.	170

ABREVIATURAS

1G	Combustible de primera generación
2G	Combustible de segunda generación
3G	Combustible de tercera generación
3'UTR	Región 3' no traducida
5' UTR	Región 5' no traducida
A	Tasa de asimilación de CO ₂ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
A	Base nitrogenada adenina
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
AF	Area foliar (m^2) / <i>Leaf area</i>
AFE	Area foliar específica (m^2/kg) / <i>Specific leaf area</i>
AIE	Agencia Internacional de Energía
ALM	Almidón
A_{max}	Tasa de fotosíntesis neta máxima a saturación de CO ₂ y luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
AMF	Área de masa foliar (g m^{-2}) / <i>Leaf mass area</i>
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
A_{sat}	Tasa de fotosíntesis neta a saturación de luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
AST	Azúcares solubles totales
C	Base nitrogenada citosina
C	Carbono
c_a	Concentración de CO ₂ ambiental ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)
CCiTUB	Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona
CE	Comisión Europea
CHR	Contenido hídrico relativo (%) / <i>Relative water content</i>
c_i	Concentración de CO ₂ intercelular ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)
cm	Centímetros
CM	Capacidad de maceta
CO₂	Dióxido de carbono

C₃	Mecanismo fotosintético cuyo producto inmediato de la fijación del CO ₂ es un ácido de 3 carbonos
C₄	Mecanismo fotosintético cuyo producto inmediato de la fijación del CO ₂ es un ácido de 4 carbonos
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DPV	Déficit de presión de vapor (kPa)
EA-IRMS	<i>Elemental analysis - Isotope Ratio Mass Spectrometer</i>
EBI	<i>European Bioinformatic Institute</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EtBr	Bromuro de etidio
ETR	Tasa de tolerancia de error
EUA	Eficiencia en el uso del agua
F	Cebador directo o <i>forward</i>
F_v/F_m	Máximo rendimiento cuántico del PSII
F_v/F_m'	Eficiencia de la captura de la energía de excitación por los centros de reacción abiertos del PSII
G	Base nitrogenada guanina
GBS	<i>Genotyping by sequencing</i>
GHG	Gases de efecto invernadero / <i>Greenhouse gases</i>
GRP	Gramíneas rizomatosas perennes
g_s	Conductancia estomática (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)
GWAS	<i>Genome-Wide Association Studies</i>
HCl	Ácido clorhídrico
HR	Humedad relativa (%)
I + D	Investigación y desarrollo
J_{max}	Tasa máxima del transporte de electrones (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)
Kb	Kilobase
SM	Sequía moderada
MOT	Materia orgánica total
N	Nitrógeno

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
N:P:K	Nitrógeno:Fósforo:Potasio
Nt	Nucleótido
pb	Pares de bases
PF	Peso fresco (g)
PFT	Peso fresco turgente de la hoja (g)
PS	Peso seco (g)
PAR	Radiación fotosintéticamente activa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Pee Dee Belemnite
PPFD	Densidad de flujo fotónico fotosintético ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
ppm	Partes por millón
PM	Peso molecular
PSII	Fotosistema dos
PST	Peso seco total (g)
R	Cebador reverso o <i>reverse</i>
R	Tratamiento con riego
Rd	Respiración en oscuridad ($\mu\text{mol g PS}^{-1} \text{s}^{-1}$)
RE	Enzima de restricción
RNasa A	Ribonucleasa A
RuBisCO	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
S	Tratamiento de secano
SCE	Servicio de Campos Experimentales
SE	Error estándar
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple
SS	Sequía severa
S/R	<i>Shoot/Root</i> (g g^{-1})
T	Base nitrogenada timina
TAE	Tampón Tris-acetato/EDTA
TO	Determinaciones antes del marcaje

T₀	Primera medición en campo realizada en primavera (mayo)
T1	Determinaciones 24 horas después del marcaje
T₁	Segunda medición en campo realizada a principios del verano (julio)
T2	Determinaciones realizadas siete días después del marcaje
T_i	Tiempo inicial
T_f	Tiempo final
T_m	Temperatura de fusión del ADN
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
U	Unidades de actividad enzimática
UE	Unión Europea
UNEAK	<i>Universal Network Enabled Analysis Kit</i>
V	Voltios
V_{c, max}	Tasa de carboxilación máxima de la RuBisCO ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
W	Base nitrogenada adenina o timina
$\delta^{13}\text{C}$	Composición isotópica de ^{13}C
$\Delta^{13}\text{C}$	Discriminación isotópica de ^{13}C

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cambio climático

Según el Panel Intergubernamental del Cambio Climático (IPCC, 2007), se ha detectado la influencia humana como la causa dominante del calentamiento global observado desde mediados del siglo XX en el calentamiento de la atmósfera (Figura 1.1) y los océanos, en las alteraciones en el ciclo global del agua, en las reducciones de la cantidad de nieve y hielo, en la elevación mundial del nivel del mar y cambios en algunos fenómenos climáticos extremos, debido a un incremento del CO₂ en la atmósfera (Figura 1.1). Actualmente, contamos con aproximadamente 400 ppm de CO₂ en el ambiente y una temperatura media de la tierra de 15 °C (IPCC, 2014).

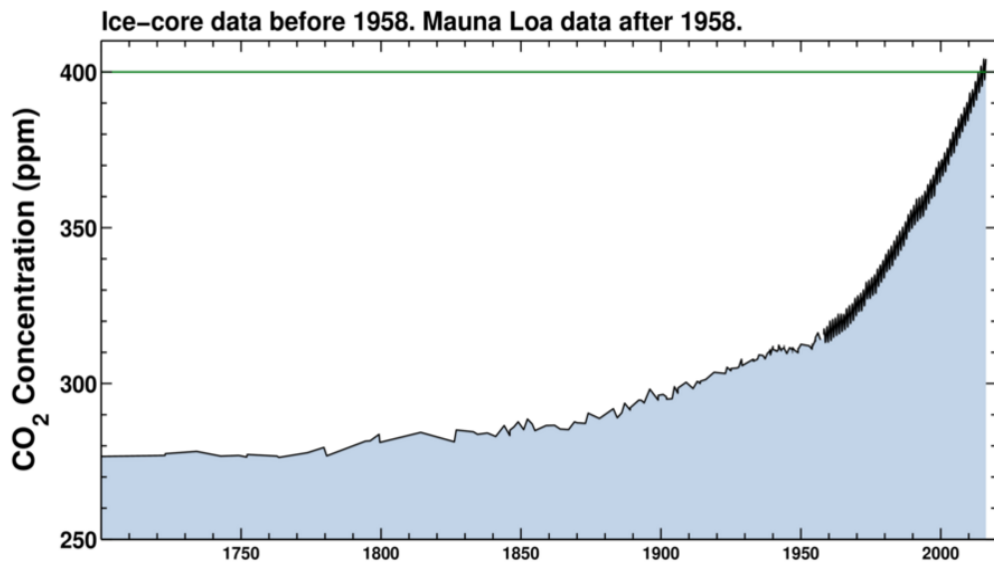


Figura 1.1. Evolución de la cantidad de CO₂ en la atmósfera desde 1700 hasta la actualidad. Las lecturas de antes de 1960 fueron analizadas a partir de burbujas de aire atrapadas en hielo. Las lecturas después de 1960 fueron analizadas a partir de muestras de aire del observatorio de Mauna Loa (Hawái; Keeling *et al.*, 2001).

Se prevé que a finales del siglo XXI, la temperatura media de la tierra incremente entre 2 y 4 °C, además que los procesos del ciclo del carbono (C) agudicen el aumento de CO₂ en la atmósfera. Las emisiones de CO₂ acumuladas determinarán en gran medida el calentamiento medio global a finales del siglo XXI y posteriormente. La mayoría de los aspectos del cambio

climático perdurarán durante muchos siglos, incluso aunque pararan las emisiones de CO₂, debido a las emisiones de CO₂ pasadas, presentes y futuras (Stocker *et al.*, 2013).

Según el último acuerdo de la XXI Conferencia sobre Cambio Climático desarrollada en diciembre de 2015 en París, se acordó por consenso, reducir las emisiones como parte del método para la disminución de gases del efecto invernadero. De esta manera, se intentará mantener el calentamiento global por debajo de los 2 °C (FCCC, 2015).

El cambio climático, además, podría alterar los patrones de distribución de las especies, la disponibilidad de hábitat y funciones de los ecosistemas (IPCC, 2007). La producción agrícola también es probable que se vea afectada por los cambios en las precipitaciones y la temperatura (Rosenzweig y Parry, 1994), que se intentará mitigar con el mejoramiento de cultivos, las técnicas de manejo adaptativo o cambios a los cultivos nuevos (CCSP, 2008). La disminución en la disponibilidad de agua, conduciría a períodos de sequía más prolongados y, por lo tanto, a la reducción de la disponibilidad de los recursos hídricos sobre todo en regiones de clima Mediterráneo (IPCC, 2014). Debido a que la quema de combustibles fósiles contamina altamente el ambiente, una economía basada en la utilización de energía alternativa a partir de biomasa y otras fuentes renovables (como la energía solar y/o eólica), parecen ser la opción más viable (Zidanšek *et al.*, 2009).

Con el objetivo de abordar el problema del cambio climático y para alcanzar la independencia de los combustibles fósiles, es necesario aumentar el uso de energías renovables reduciendo la emisión de gases de efecto invernadero.

1.2. La bioenergía

Desde de la revolución industrial, se han utilizado los combustibles fósiles (especialmente petróleo) como principal fuente de energía. Actualmente, se consideran recursos cada vez más limitados, difíciles de extraer, costosos y objeto de un intenso debate político (Charles *et al.*, 2007). Sin embargo, se

estima que el consumo de energía mundial continúe en aumento (IEO, 2014). Parrish y Fike (2005), señalan que actualmente los dos aspectos de mayor importancia son: (i) la amenaza del agotamiento de los combustibles fósiles y (ii) la necesidad de reducir las emisiones de CO₂. Es por ello que la crisis energética mundial está impulsando la búsqueda de nuevas fuentes de energías renovables.

La bioenergía puede producirse a partir de una variedad de materias primas orgánicas, como la biomasa, incluidos los residuos forestales, agrícolas y ganaderos; las plantaciones forestales de rotación corta; los cultivos energéticos; el componente orgánico de los residuos sólidos urbanos y otros residuos orgánicos.

A través de una variedad de procesos, estas materias primas se pueden utilizar directamente para producir electricidad o calor, o se pueden utilizar para crear combustible gaseoso, líquido o sólido.

Según la Agencia Internacional de Energía (AIE), actualmente, la bioenergía es la única fuente de energía renovable grande, proporcionando el 10 % del suministro mundial de energía primaria.

La gama de tecnologías de bioenergía es amplia y la técnica varía sustancialmente. Algunos ejemplos de las tecnologías disponibles en el mercado incluyen: calderas de pequeña y gran escala, sistemas de calefacción a base de *pellets* domésticos y la producción de etanol a partir de azúcar y almidón. La producción de biocombustibles gaseosos para el transporte basados en lignocelulosa son ejemplos de tecnologías que están en una etapa pre-comercial, mientras que la producción de biocombustibles líquidos a partir de algas y algunos otros métodos de conversión biológicos se encuentran en fase de investigación y desarrollo (I + D; Arvizu *et al.*, 2011).

Las aplicaciones de tecnología en bioenergía comercial incluyen la producción de calor, con escalas que van desde cocinas caseras con estufas a grandes sistemas de calefacción urbana; la generación de energía a partir de biomasa a través de la combustión, o co-combustión de biomasa y combustibles fósiles; y los biocombustibles líquidos de primera generación de cultivos

oleaginosos (biodiésel) y cultivos de azúcar y almidón (bioetanol), uso de biomasa acuática, entre otros.

Las tecnologías de bioenergía tienen aplicaciones en entornos centralizados y descentralizados. El uso tradicional de la biomasa en los países en desarrollo es la aplicación actual más extendida. La bioenergía normalmente ofrece una salida constante o controlable. Los proyectos de bioenergía generalmente dependen de la disponibilidad de suministro de combustible local y regional, pero los últimos acontecimientos muestran que la biomasa y los biocombustibles son cada vez más objeto de comercio internacional (IPCC, 2011).

1.3. La biomasa

La biomasa es cualquier materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía, como por ejemplo: la materia derivada de plantas o animales en una base renovable. La biomasa incluye: madera, cultivos agrícolas (cultivos herbáceos y cultivos leñosos), residuos orgánicos municipales, así como estiércol. La biomasa, como recurso energético, puede clasificarse en biomasa natural, residual y de cultivos energéticos (Margalef, 1980).

La biomasa natural, es la que se produce en la naturaleza sin intervención humana. Como por ejemplo, la caída natural de las ramas de los árboles (poda natural) en los bosques.

La biomasa residual, es el subproducto o residuo generado en las actividades agrícolas (poda mecánica, rastrojos, restos de cosechas, etc.), silvícolas y ganaderas, así como residuos de la industria agroalimentaria y en la industria de transformación de la madera, así como residuos de depuradoras y el reciclado de aceites.

Los cultivos energéticos son aquellos que están destinados a la producción de biocombustibles. Además de los cultivos existentes para la industria alimentaria (cereales y remolacha para producción de bioetanol y

oleaginosas para producción de biodiésel). Existen otros cultivos como algunas gramíneas perennes por ejemplo *Arundo donax* L., *Panicum virgatum* L., *Miscanthus* spp., entre otros.

De acuerdo a la AIE, existen dos clasificaciones del uso de la biomasa: el uso tradicional y el uso moderno. La biomasa tradicional se refiere al consumo de biomasa en el sector residencial en los países en desarrollo y a la utilización a menudo insostenible de madera, carbón vegetal, residuos agrícolas y estiércol para cocinar y calentarse. Cualquier otro uso de biomasa se define como moderno.

1.4. Los biocombustibles

Dada la necesidad de desarrollar nuevas fuentes de energía alternativa, varias especies de plantas han sido estudiadas para la producción de biocombustibles (Alison y Raman, 2013).

Los biocombustibles son combustibles producidos a partir de biomasa, por ejemplo, aceite de soja, alcohol de azúcar fermentada, madera, residuos orgánicos, etc. Los biocombustibles se clasifican en biocombustibles de primera (1G), segunda (2G) y tercera generación (3G) (Verbruggen, 2011).

1G: Producidos a partir de biomasa de cultivos utilizados para el consumo humano, principalmente granos y semillas oleaginosas (los cuales son producidos principalmente a partir de cultivos alimenticios como el girasol, la soja y el sorgo) o a partir de toda la planta (maíz, caña de azúcar, etc). Sin embargo, la producción de biocombustibles a partir de este tipo cultivos se ha enfrentado a fuertes críticas en cuanto a su sostenibilidad y sobre todo al uso de tierra agrícola que es necesaria para su cultivo, situación que lleva a la escasez de alimentos y al aumento de los precios. Por otro lado, la liberación de gases de efecto invernadero (GHG) asociados con los cambios de uso del suelo ha llevado a discusiones polémicas sobre la eficacia de los

biocombustibles de primera generación para reducir las emisiones globales de C (Naik *et al.*, 2010).

2G: Producidos a partir de la biomasa de cultivos energéticos ricos en reservas almidonadas (celulosa, hemicelulosa o lignina), como por ejemplo algunas gramíneas perennes, especies forestales y residuos de la industria de la madera, grasas animales, residuos de aceite de cocina, etc. (Lynd *et al.*, 2003). Para su producción se utilizan procesos no tradicionales de conversión bioquímica y termoquímica. El desarrollo de los biocombustibles 2G ofrece la oportunidad de evitar la competencia de la tierra para la producción de alimentos y materias primas para explotar los suelos no aptos para los cultivos de alimentos y generar mayor eficiencia de conversión (McLaughlin y Adams Kszos, 2005; Idris *et al.*, 2012).

3G: Producidos a partir de la biomasa de cultivos de organismos autótrofos acuáticos (algas) con procesos avanzados que se encuentran en fase de desarrollo. Esto significa, que un organismo heterótrofo (utilizando azúcar o celulosa para producir biocombustibles) no sería considerado como 3G (EBTP, 2015).

Los biocombustibles 2G y 3G, producidos a través de nuevos procesos también se les conocen como biocombustibles avanzados, de nueva generación (*next generation*) o tecnologías de biocombustibles avanzados.

Según la AIE, existen dos clasificaciones de tecnologías de biocombustibles: los convencionales y los avanzados.

Las tecnologías de biocombustibles convencionales incluyen procesos bien establecidos que se encuentran produciendo biocombustibles a escala comercial. Estos biocombustibles, comúnmente conocidos como 1G, incluyen el bioetanol a base de azúcar y almidón, cultivos oleaginosos para biodiésel a base de aceite vegetal, así como derivados de biogás a través de la digestión anaeróbica. Las materias primas típicas utilizadas en estos procesos incluyen

la caña de azúcar y la remolacha azucarera, los granos de almidón a partir de cultivos de maíz y trigo, cultivos oleaginosos como la canola, soja y aceite de palma y, en algunos casos las grasas de animales y los aceites de cocina usados.

Las tecnologías avanzadas de biocombustibles son las tecnologías de conversión que están todavía en I + D, fase piloto o fase de demostración, denominadas comúnmente como de 2G o 3G. Esta categoría incluye los biocombustibles a partir de biomasa lignocelulósica, como etanol-celulósico, biomasa a líquido (*biomass to liquid* BTL) diésel y gas biosintético (bio-SG). La categoría también incluye nuevas tecnologías que se encuentran principalmente en I + D y fase piloto, como los biocombustibles a base de algas y la conversión de azúcar en biocombustibles de tipo diésel que utilizan catalizadores biológicos o químicos.

1.5. Las gramíneas perennes como fuente de biomasa

En los últimos años, la Comisión Europea (CE) ha estado fomentado el uso de biomasa para biocombustibles. Según la última directiva de la CE, se establece que los estados miembros de la Unión Europea (UE) deben aumentar gradualmente el consumo de biomasa y en el año 2020 el 20 % del consumo energético de la UE debería ser a partir de recursos renovables (Directiva 2009/28 /EC).

En particular, en el sector agrícola europeo, la implantación de cultivos no alimentarios para la producción de energía podría proporcionar una buena oportunidad para los márgenes de ingresos y beneficios (McKendry, 2002). En Europa, el cultivo de plantas para biomasa de alto rendimiento (cultivos energéticos) en tierra pobres y barbechos pueden proporcionar a los agricultores una oportunidad para diversificar su producción, aumentar sus márgenes de beneficio y cubrir sus riesgos financieros sin comprometer el suministro de alimentos ni las tierras agrícolas (McKendry, 2002).

Entre las características que hacen atractivas a las gramíneas perennes como fuente de biomasa para la producción de biocombustibles, están su alta

capacidad fotosintética (mayor capacidad de fijar CO₂), alto potencial de rendimiento, altos contenidos de azúcares, lignina y celulosa y su bajo impacto ambiental en comparación con otros cultivos anuales (Jaradat, 2010; Ceotto *et al.*, 2013). Las gramíneas perennes no compiten por el uso de las tierras agrícolas, ya que pueden cultivarse en tierras marginales o degradadas (Lewandowski *et al.*, 2003) y, a su vez, proporcionar beneficios en términos de estructura y estabilidad (reduciendo la pérdida de suelo debido a la erosión y la escorrentía) y calidad del suelo (por ejemplo, aumento de la fertilidad a nivel de la materia orgánica y retención de nutrientes; Angelini *et al.*, 2009).

En Europa, cerca de 20 especies perennes han sido estudiadas y, tres gramíneas rizomatosas perennes (GRP; *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L.) han sido elegidas para programas de investigación más amplios (Lewandowski *et al.*, 2003). Estas especies, se caracterizan por ser gramíneas herbáceas y de ciclo perenne ya que pueden durar entre 15 y 20 años. Su crecimiento se da durante la estación cálida (primavera- verano) y poseen una alta productividad de biomasa. De estas tres especies, *A. donax* es la que presenta un mayor potencial para la producción de biomasa en ambiente Mediterráneo (Webster *et al.*, 2016).

1.6. *Arundo donax* L.

Arundo donax L. es una gramínea perenne conocida como "caña común" o "giant reed" que pertenece a la familia Poaceae (Tabla 1.1). Se cree que *A. donax* ha sido diseminada desde Asia y se ha naturalizado en el resto de la región Mediterránea y al norte de África, hasta extenderse al continente americano (Bayer *et al.*, 1989).

Es una especie con vía fotosintética C₃, pero presenta altas tasas de asimilación fotosintética y potencial fotosintético comparado con las C₄, que no son usuales para las plantas C₃ (Rossa *et al.*, 1998).

Tabla 1.1. Clasificación de *A. donax* L., según el *European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute* (EBI,2014).

REINO	Plantae
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Liliopsida
ORDEN	Poales
FAMILIA	Poaceae
GÉNERO	<i>Arundo</i>
ESPECIE	<i>Arundo donax</i> L.

Es una de las plantas herbáceas de mayor tamaño y una de las gramíneas más grandes del mundo (las cañas pueden alcanzar entre 8 y 10 m de altura y de 3 a 4 cm de diámetro) y las raíces una profundidad de 5 m (Perdue, 1958; Frandsen, 1997), tiene largas hojas lanceoladas que pueden llegar a medir hasta un metro (Tucker, 1990) y grandes panículas que contienen las flores. Es una planta de semillas inviábiles que se reproduce solo a través de los rizomas y/o fragmentos de caña que son transportados por el agua o por acción humana (Pilu *et al.*, 2013). Es por estas características, que algunos autores la han considerado como especie invasora (Angelini *et al.*, 2009). Sin embargo, no se considera un peligro inminente debido a la ausencia de reproducción sexual, de manera que cómo solo presenta reproducción vegetativa, podría ser más fácil controlar su expansión.

Las causas de la infertilidad de *A. donax* no se conocen en detalle, algunas investigaciones sugieren la hipótesis sobre el origen de esta planta. De acuerdo con Bucci *et al.* (2013), podría ser el resultado del cruce entre *Arundo plinii* y un diploide de la misma especie, dando como resultado un triploide estéril o, del cruce entre un tetraploide fértil de *A. plinii* y *Phragmites australis*, dando como resultado un híbrido estéril (Figura 1.2).

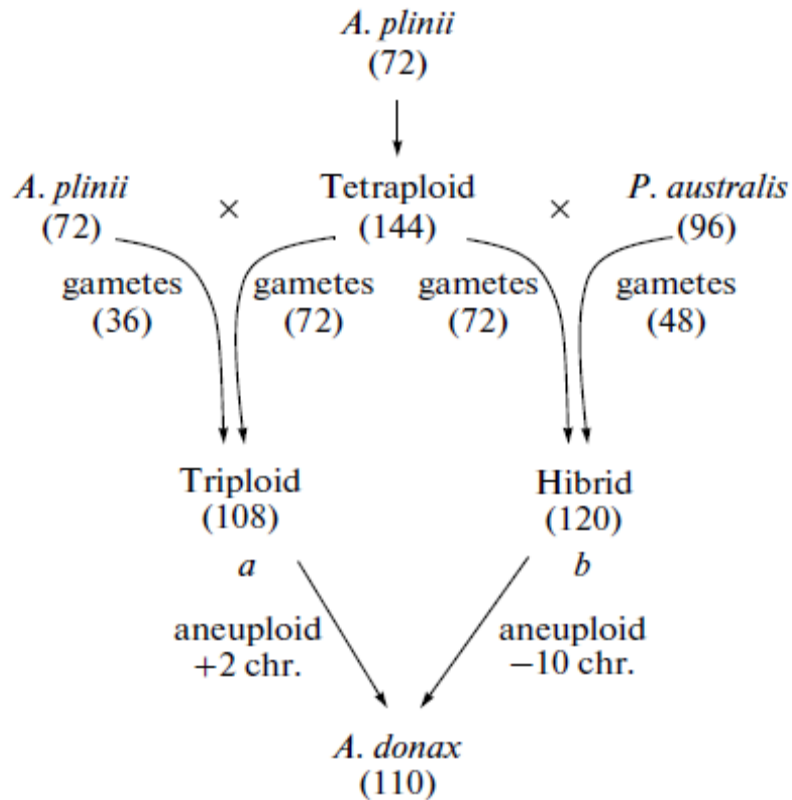


Figura 1.2. Hipótesis sobre el origen filogenético de *A. donax* asumiendo un número de cromosomas de 110 (Bucci *et al.*, 2013)

Otra particularidad de *A. donax* es el número de cromosomas, así los investigadores reportan diferentes números que varían dependiendo del lugar del muestreo de la planta. Los resultados de estas investigaciones varían desde 24 cromosomas (Hunter, 1934) hasta 110 cromosomas (Bucci *et al.*, 2013). Es por esta razón que los estudios moleculares en *A. donax* son aún incipientes. Hasta la fecha, no se cuenta con el mapa genético de la especie, por el momento solo se tiene una secuencia de 215 pb (Pilu *et al.*, 2014).

A. donax es capaz de crecer en una amplia gama de suelos y condiciones ambientales, incluyendo los suelos inhóspitos o marginales, aunque es considerada una planta acuática emergente (Cook, 1990). Sin embargo, una vez establecida no precisa de un aporte constante de agua, por lo que puede crecer en lugares secos. Después del primer año de crecimiento, se vuelve

relativamente tolerante a la sequía, pero también sobrevive en sitios muy húmedos y en suelos salinos (Pilu *et al.*, 2012; Webster *et al.*, 2016), lo que hace a esta planta una alternativa viable para la producción de biocombustibles en zonas marginales, pudiendo mantenerse los cultivos hasta por 15 años y producir hasta 60 t/hectárea de materia seca.

En la zona Mediterránea, el crecimiento de los brotes de *A. donax* se da a inicios de la primavera (marzo) y continúa durante todo el ciclo vegetativo hasta la floración (agosto-noviembre). A finales del otoño, las cañas se vuelven amarillas y generalmente pierden las hojas y las inflorescencias (Tucker, 1990).

1.7. La biotecnología aplicada a *Arundo donax* L.

A pesar del creciente interés en el uso de gramíneas perennes como fuente de biomasa para la producción de biocombustibles, se sabe poco sobre la biología básica, fisiología, bioquímica, genética y ecología de esta especie. Por lo tanto, existe la necesidad de caracterizarla desde sus tolerancias fisiológicas y ambientales (importante para identificar los ecosistemas más adecuados para su producción agronómica; Barney *et al.*, 2009; Chaves *et al.*, 2009), la cantidad de reservas en azúcares y almidón (implicados directamente con la obtención del producto final), así como su estructura genética (para estudios futuros de mejoramiento). Además, entender cómo varía el rendimiento de la biomasa según la gestión de los recursos y las condiciones ambientales, es de gran importancia en la industria de los biocombustibles (Lasorella *et al.*, 2011; Kiniry *et al.*, 2012).

A pesar de ello, desde hace unos años, se vienen desarrollando algunas investigaciones con gramíneas perennes para la producción de biocombustibles. *A. donax* es una de las especies más estudiadas en los últimos tiempos por ser una planta de crecimiento rápido, necesita pocos cuidados y es tolerante a situaciones adversas (Pilu *et al.*, 2012).

Desde el punto de vista energético, *A. donax* se puede utilizar para producir energía por combustión directa o para la producción de biocombustibles 2G,

como el bioetanol, generados por fermentación alcohólica de biomasa lignocelulósica pretratada para facilitar la liberación de azúcar (Scordia *et al.*, 2012). Sin embargo, los procesos de pretratamiento utilizados para aumentar la degradabilidad de los hidratos de carbono (por ejemplo, explosión de vapor, tratamiento con ácido y calor) consumen energía. Por esta razón, uno de los objetivos de la mejora genética de *A. donax* (y en otras gramíneas) debe consistir en la modificación de la composición de la pared celular con el fin de facilitar el uso de los productos de lignocelulosa en la biomasa.

Desde el punto de vista de producción, según las investigaciones de Schievano *et al.* (2012), *A. donax* podría ser considerado un buen candidato para complementar/sustituir al maíz, sorgo y otros cultivos energéticos de 1G, en particular, para alimentar a los digestores anaeróbicos y para producir energía verde (en el norte de Italia y de esta manera extrapolarlo a nivel mundial).

1.8. Conceptos básicos sobre biología molecular

Durante los últimos treinta años, el mundo científico en general ha sido testigo de una de las revoluciones tecnológicas más importante en las ciencias biológicas: el desarrollo de la tecnología de biología molecular. Su aplicación al desciframiento del ADN ha ayudado a construir mapas genéticos y, de esta manera encontrar genes de interés.

El *International Human Genome Sequencing Consortium*, define a la biología molecular como: “El estudio de la estructura, función y composición de las moléculas biológicamente importantes” (Genome Glossary, 2003). El objetivo básico de la biología molecular es el estudio de los procesos desde un punto de vista molecular en los seres vivos, a través del ADN y las proteínas.

Los métodos que se emplean en biología molecular son diversos. Por ejemplo, destacan la microscopía electrónica (que permite resoluciones que alcanzan los 10 Å); la difracción de rayos X (que determina la estructura y disposición espacial de los átomos de las macromoléculas); la ultracentrifugación diferencial (analítica como preparativa) que permite

separaciones de soluciones que antes eran imposibles; la cromatografía de gases y de fase líquida, la espectrografía de infrarrojos, la química con isótopos trazadores, la espectrometría de masas, entre otros.

Debido al gran interés por este campo de estudio, se han desarrollado varias técnicas que permiten identificar genes. Los primeros métodos estuvieron basados principalmente en las técnicas de hibridación diferencial, como la hibridación sustractiva y/o construcción de bibliotecas de ADNc sustractivas. La utilización de las PCRs en diferentes laboratorios, hizo posible el desarrollo de métodos basados en ella, que se caracterizan por ser más rápidos y versátiles que sus predecesores. En general, estos métodos permiten apreciar la expresión diferencial de genes a través de la comparación de perfiles de ADNc generados por PCR y separados mediante electroforesis en geles de policacrilamida o agarosa. De la misma manera, nuevas técnicas mucho más versátiles y económicas han sido propuestas por algunos autores (Gidekel y Barrientos, 1999). Tal es el caso del *Genotyping by sequencing* que se puede emplear cuando no se cuenta con información previa del genoma e incluso cuando se desconoce el número de cromosomas de la especie.

1.8.1. *Genotyping by sequencing*

Genotyping by sequencing (GBS) es una plataforma adecuada para desarrollar marcadores SNP de alta calidad, especialmente para las especies que no tienen genoma de referencia (Elshire *et al.*, 2011), como es el caso de *A. donax*.

El procedimiento para la construcción de bibliotecas GBS se basa en la reducción de la complejidad del genoma mediante enzimas de restricción (RE). Este enfoque es simple, rápido, extremadamente específico, altamente reproducible, y puede llegar a importantes regiones del genoma que son inaccesibles.

El *Universal Network Enabled Analysis Kit* (UNEAK) es un análisis biológico para el descubrimiento de SNPs basado en un enfoque de red. Ciertas complejidades que dificultan el descubrimiento de SNPs, como son

repeticiones, parálogos y errores de secuenciación, se resuelven fácilmente mediante esta técnica (Lu *et al.*, 2013).

Para más información sobre este método, ver el Apartado 3.3.5.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Estudiar la especie de gramínea perenne C₃ *Arundo donax* L. (“caña común”, “*giant reed*”) como candidata para la producción de biomasa en ambiente Mediterráneo.

2.2. Objetivos específicos

- Estudiar la respuesta fisiológica y parámetros de crecimiento de *A. donax* en condiciones de secano y riego en clima Mediterráneo.
- Estudiar la respuesta fisiológica y parámetros de crecimiento de *A. donax* en condiciones de sequía y control en invernadero.
- Estudiar la composición isotópica ¹³C del CO₂ respirado, materia orgánica total, azúcares solubles y almidón de *A. donax* en todos los órganos de la planta (hoja, tallo, raíz y rizoma) bajo distintas condiciones hídricas.
- Determinar el número de cromosomas de diferentes ecotipos de *A. donax*.
- Construir árboles filogenéticos (mediante GBS) entre los diferentes ecotipos de *A. donax* estudiados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se presenta un resumen de las condiciones experimentales, los ecotipos utilizados, los tratamientos y los análisis realizados en los tres experimentos llevados a cabo en esta Tesis (Tabla 3.1), que se explicarán a lo largo de este capítulo.

Tabla 3.1. Resumen del diseño experimental: Experimento, localización del experimento, condiciones experimentales, ecotipos y análisis realizados.

Experimento	Ubicación	Condiciones experimentales		Ecotipo	Análisis
I	Barcelona	Campo	Estrés hídrico	1 clon de <i>A. donax</i> "Piccoplant"	Fisiológicos Moleculares
II	Barcelona	Invernadero	Estrés hídrico	1 clon de <i>A. donax</i> "Piccoplant"	Fisiológicos Bioquímicos
III	Barcelona ¹ Wuhan ²	Invernadero ¹ Laboratorio ²	Condiciones óptimas	5 "clones de <i>A. donax</i> "Piccoplant" "Martinensis" "Fondachello" "Argentum" "Granadensis"	Fisiológicos Moleculares

3.1. Material vegetal

Esta Tesis se ha basado en el estudio de *A. donax*, para lo cual se utilizaron cinco ecotipos descritos en la Tabla 3.2.

El ecotipo Piccoplant fue proporcionado por la empresa privada Piccoplant (Oldenburg, Alemania), mientras que el resto de ecotipos fueron recogidos en diferentes partes del mundo (España, Italia y Argentina).

El ecotipo Fondachello, fue recolectado en el Campo Experimental de la Universidad de Catania (UNICT), en Italia (10 m.s.n.m; 37°24'N 15°03'E) y su origen está descrito en Cosentino *et al.* (2006).

Tabla 3.2. Ecotipos, lugar de origen y tipo (comercial o silvestre) de las plantas de *A. donax* utilizadas en esta Tesis.

Ecotipo	Origen	Tipo
Piccoplant	Oldenburg, Alemania	Comercial
Martinensis	Cataluña, España	Silvestre
Fondachello	Catania, Italia	Silvestre
Argentum	Córdoba, Argentina	Silvestre
Granadensis	Andalucía, España	Silvestre

Los ecotipos Martinensis y Granadensis fueron recogidos en España, particularmente en Sant Martí Sarroca, Cataluña, España (291 m.s.n.m; 41°23'4"N 1°36'43"E) y en Granada, Andalucía, España (773 m.s.n.m; 37°10'41"N 3°36'03"O), respectivamente y su origen está descrito en Sánchez *et al.* (2015, 2016).

Finalmente, el ecotipo Argentum fue recogido en Córdoba, Argentina (352 m.s.n.m; 31°25'00"S 64°11'00"O).

Todos los ecotipos, a excepción de las primeras plantas de Piccoplant, fueron multiplicados a partir de rizomas.

3.2. Diseño experimental y condiciones de cultivo

Como se ha comentado con anterioridad, esta Tesis se ha subdividido en tres experimentos, que se explicarán a continuación.

3.2.1. Experimento I: Estudio del efecto del secano en plantas de *Arundo donax* L. en condiciones de campo

Este experimento se llevó a cabo en las parcelas de campo del Servicio de Campos Experimentales (SCE) de la Facultad de Biología de la UB (Coordenadas: 41°23'7"N 2°7'11"E).

Para ello, la tierra se preparó mediante fresado con tractor, rastrillado y nivelado. El terreno fue dividido en dos parcelas de trabajo de 1.8 m x 1.8 m (3.24 m²) cada una, y se trasplantaron 16 plantas de *A. donax* del ecotipo Piccoplant en cada una de las parcelas experimentales. El tipo de suelo del SCE, corresponde a un suelo tipo E (luvisol cálcico), arcilloso; derivado de sedimentos coluviales y aluviales característicos de los suelos mediterráneos y subtropicales (Sauras *et al.*, 1999). Al inicio de la primavera, se fertilizaron ambas parcelas con N:P:K (15:15:15) con una dosis de 5 g m⁻².

En cada una de las parcelas se realizó un tratamiento de condiciones hídricas diferente, que fueron:

- Tratamiento de secano (S): La parcela recibió únicamente agua de lluvia durante todo el experimento (Figura 3.1).
- Tratamiento de regadío (R): La parcela recibió al igual que el tratamiento S agua de lluvia durante todo el experimento y además, recibió un riego suplementario de 50 mm H₂O/mes durante los meses de menor precipitación (desde mayo a agosto; Figura 3.1).

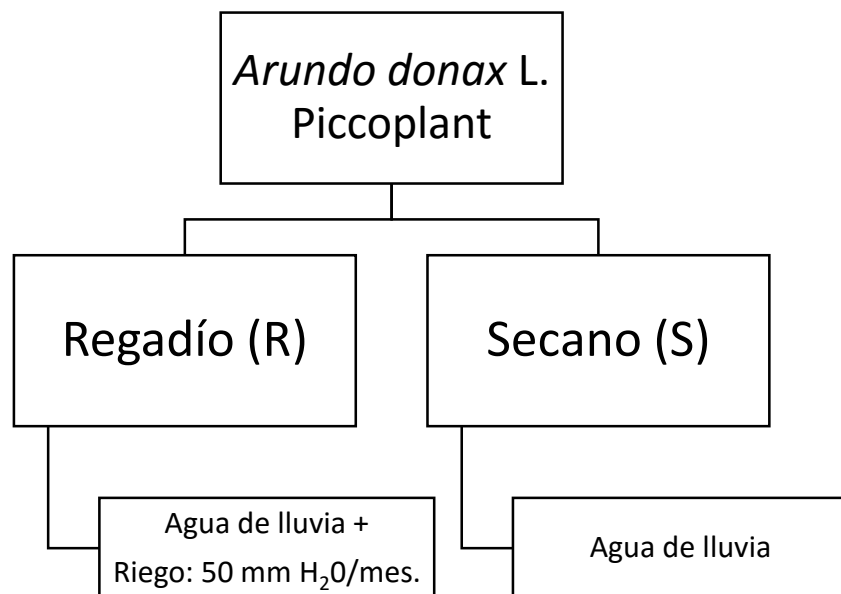


Figura 3.1. Esquema del diseño del Experimento I.

La parcela del tratamiento de regadío (R), recibió un riego suplementario de 200 mm de agua durante los cuatro meses, correspondientes a la estación de verano (mayo - agosto). La precipitación acumulada durante los meses que duró el experimento y los 200 mm de riego adicionales, sumaron un total de agua para la parcela R de 322.5 mm para el año 2013.

Los datos meteorológicos de temperatura (°C) y humedad relativa del ambiente (%) registrados durante el período de ensayo, fueron facilitados por el Observatorio Meteorológico del Departamento de Astronomía y Meteorología de la Facultad de Física de la UB. Los datos de precipitación acumulada (mensual) se obtuvieron a partir de los registros del pluviómetro ubicado a 10 m del ensayo en el propio SCE. Con esos datos, se elaboró la Tabla 3.3 correspondiente al periodo primavera-verano de 2013.

Tabla 3.3. Media mensual de los datos de temperatura (°C) y humedad relativa del ambiente (%), aportados por la Estación Meteorológica del Departamento de Astronomía y Meteorología de la Facultad de Física de la UB y datos de precipitación mensual recogidos del pluviómetro, ubicado en el SCE de la Facultad de Biología de la UB, correspondientes al año 2013. Para este experimento se trabajó con los datos que corresponden al período de junio a septiembre, ambos inclusive.

Año	Meses	Precipitación	Temperatura media (°C)	Humedad relativa (%)
2013	Enero	30.4	11.6	62.5
	Febrero	52.6	10.1	62.5
	Marzo	109.9	13.4	69.1
	Abril	80.4	15.4	66.9
	Mayo	56.0	16.8	70.4
	Junio	18.3	21.8	67.8
	Julio	42.0	26.4	67.6
	Agosto	6.2	25.7	69.6
	Septiembre	18.8	23.1	73.9
	Octubre	20.5	20.8	77.3
	Noviembre	108.5	14.2	62.4
	Diciembre	12	11.9	66.4
Precipitación acumulada en el experimento		122.5	-	-
Precipitación acumulada anual		555.6	-	-

La precipitación acumulada durante el periodo que duró el experimento fue de 122.5 mm. Cabe señalar que la distribución anual de la precipitación en el ambiente Mediterráneo es de tipo bimodal (Tabla 3.3), quiere decir que las lluvias se encuentran repartidas usualmente durante las estaciones intermedias (otoño y primavera), mientras que los periodos más secos se encuentran en las estaciones de invierno y verano.

Las mediciones se realizaron en dos tiempos:

- a) T_0 : Se realizó en primavera (mayo) de 2013, cuando las plantas ya habían rebrotado solo con el agua de lluvia caída hasta ese momento. A partir de T_0 , se inició la aplicación de riego suplementario solo en la parcela R).
- b) T_1 : Se realizó aproximadamente dos meses después del T_0 , es decir durante el verano (agosto) de 2013.

3.2.2. Experimento II: Estudio del efecto del estrés hídrico en plantas de *Arundo donax* L. en condiciones de invernadero

Las plantas de *A. donax* del ecotipo Piccoplant (Tabla 3.1) fueron multiplicadas a partir de rizomas de un tamaño similar (20.1 ± 0.36) y crecieron durante 4 meses (enero a abril de 2013) en condiciones controladas en invernadero (temperatura promedio: 25/15 °C día/noche, déficit de presión de vapor (DPV): 0.75 kPa, humedad relativa (HR): 40 - 65 %, máxima densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD): $\sim 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $\delta^{13}\text{C}$ de CO_2 del aire en el invernadero: $-11.8 \text{‰} \pm 0.1 \text{‰}$), en macetas de plástico de 9 L con sustrato turba, perlita y vermiculita (2:1:1) y en condiciones hídricas óptimas, con riego automático con agua y solución Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950).

En este experimento se realizaron tres tratamientos en relación al contenido hídrico (Figura 3.2).

- a) Control (C: 100 % Capacidad de maceta)

- b) Sequía moderada (SM: 50 % CM)
- c) Sequía severa (SS: 25 % CM)

Se eligieron tres lotes de plantas (n=9) similares entre ellas en cuanto a tamaño y se sometieron a un estrés hídrico durante 21 días.

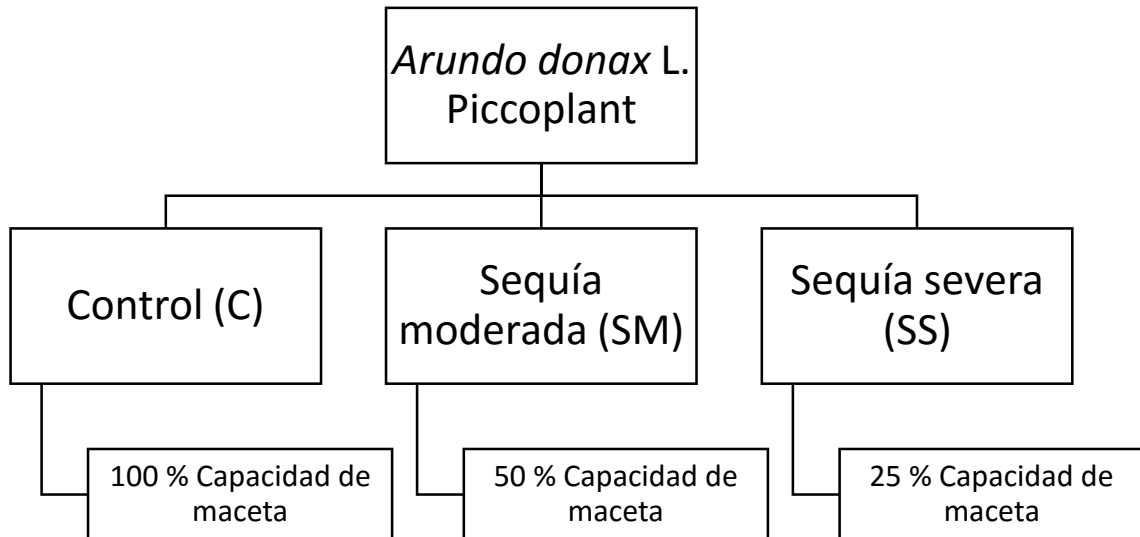


Figura 3.2. Esquema del diseño del Experimento II.

3.2.3. Experimento III: Estudio molecular de cinco ecotipos de *Arundo donax* L.

En este experimento se utilizaron cinco ecotipos de *A. donax* (Piccoplant, Martinensis, Fondachello, Argentum y Granadensis; Tabla 3.1 y Figura 3.3) que fueron cultivados durante cuatro meses en condiciones óptimas de crecimiento en invernadero, explicadas anteriormente en el Experimento II (Apartado 3.2.2).

En el Experimento III no se realizó ningún tratamiento de estrés, sino que para el estudio molecular (Apartado 3.3.5) se utilizaron plantas bien regadas, que fueron tratadas como plantas controles.

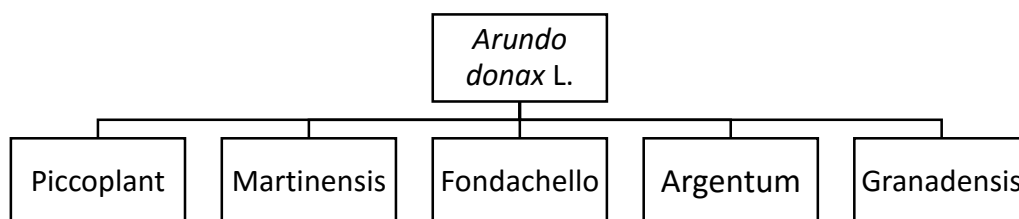


Figura 3.3. Esquema del diseño del Experimento III.

3.3. Metodología

3.3.1. Medidas de crecimiento

Para realizar un análisis de la biomasa se midieron los siguientes parámetros:

3.3.1.1. Altura del tallo (Experimento I y II)

La altura de los tallos (m) se midió en los tiempos correspondientes establecidos para cada experimento (I y II). Se realizó usando una regla graduada, tomando la medida del tallo desde la base del mismo, hasta la última hoja completamente desplegada.

3.3.1.2. Peso fresco y peso seco (Experimento II y III)

Se determinó el peso fresco (PF, g) de los cuatro órganos de la planta (hoja, tallo, raíz y rizoma; Figura 3.4). Una vez cortado el material se procedió a pesarlo en una balanza de precisión. Las raíces y los rizomas (al contener sustrato), fueron lavados previamente y secados con papel absorbente para extraer la humedad.

Para determinar el contenido de materia seca (PS, g), las muestras de los cuatro órganos se secaron en una estufa a 60 °C hasta obtener un peso constante (48 - 72 h). Para este proceso se utilizó una balanza de precisión.

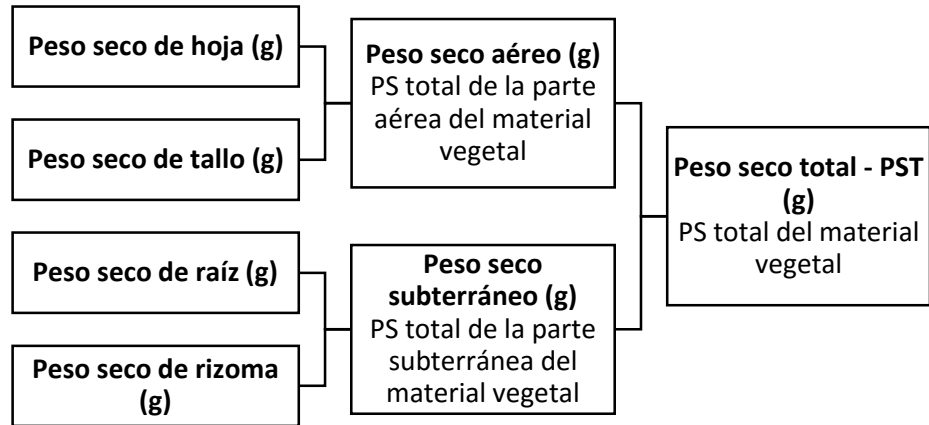


Figura 3.4. Peso de la materia seca evaluada en los experimentos.

3.3.1.3. Área foliar (Experimento II y III)

El área foliar (AF; cm²) se determinó mediante un escáner de imagen plano (Hewlett- Packard ScanJet modelo Ilcx, San Diego, EE.UU). Luego de realizar el escaneo de las hojas, las imágenes que se obtuvieron fueron analizadas con el programa de procesamiento de imágenes Image Processing Program (Image, University of Sheffield, 2003; Nogués *et al.*, 1998).

3.3.1.4. Relaciones entre fracciones (Experimento II)

A partir de los parámetros anteriormente determinados, como el peso seco del material vegetal y el área foliar, se calcularon los siguientes parámetros:

- **Área de masa foliar - AMF (g m⁻²):** Coeficiente entre el peso seco foliar y el área foliar (Poorter *et al.*, 2009).
- **Shoot/Root - S/R (g g⁻¹):** Coeficiente entre el peso seco de la parte aérea (hoja + tallo) y el peso seco de la parte subterránea (raíz + rizoma).

- **Área foliar específica - AFE ($\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$):** Coeficiente ente el área foliar y el peso de la hoja.

3.3.2. Caracterizaciones fisiológicas

3.3.2.1. Intercambio de gases (Experimento I y II)

Las mediciones se realizaron en hojas totalmente expandidas con un medidor de fotosíntesis portátil (LI-COR 6400, Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, USA) a 25 °C de temperatura foliar, 21 % O₂, un PPFD saturante de 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un 10 % de luz azul y un flujo de aire de 500 mmol s^{-1} .

3.3.2.1.1. Curvas de respuesta al CO₂ (Experimento I y II)

Se realizaron mediciones para obtener curvas de respuesta al CO₂ (A/c_i), sometiendo las hojas a diferentes concentraciones de CO₂ ambiental (c_a). Las mediciones se iniciaron con 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ y fueron disminuyendo progresivamente a 250, 100, 50, hasta 0 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$. Cuando se terminó con esta primera fase, se reinició en 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ y fue aumentando progresivamente a 750 y 1000, hasta alcanzar los 1200 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$. La estabilización y aclimatación de la hoja a cada concentración de CO₂ fue sumamente importante. Para ello se esperó entre cada medición un mínimo de 10 minutos.

Las curvas A/c_i permitieron el cálculo de algunos parámetros fotosintéticos usando ecuaciones desarrolladas por Von Caemmerer y Farquhar (1981), que se describirán a continuación:

Tasa de fotosíntesis neta a saturación de luz (A_{sat} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$):

Medición de la tasa de fijación CO₂ neta en condiciones ambientales de luz saturante.

Tasa de fotosíntesis neta máxima a saturación de CO₂ y luz (A_{max} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$): Medición de la tasa de fotosíntesis en condiciones saturante de CO₂ y luz.

Además, se pudieron obtener estimaciones mediante el método de McMurtrie y Wang (1993) para los siguientes parámetros:

Velocidad máxima de carboxilación ($V_{c,max}$, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$): Medida de la tasa máxima carboxilación o eficiencia máxima de carboxilación. Se calcula como la pendiente inicial de la porción lineal de la curva.

La tasa máxima del transporte de electrones (J_{max} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$): Medida de la tasa máxima de transporte de electrones que contribuyen a la regeneración de la enzima RuBP basado en el requerimiento de NADPH. Se estima a partir de la asíntota horizontal de cada curva A/c_i individual. El parámetro indica el funcionamiento del transporte electrónico en las membranas tilacoidales bajo diferentes situaciones de estrés.

3.3.2.1.2. Curvas de respuesta a la luz (Experimento I)

Además de la respuesta al CO₂, se realizaron curvas de respuesta de fotosíntesis a la luz absorbida (A/PAR_i). Las curvas comenzaron a niveles máximos de luz de 2000 $\mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, y fueron disminuyendo gradualmente a 1200, 600, 300, 100, 50, 30 hasta 0 $\mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Se mantuvieron controlados los siguientes parámetros: temperatura foliar a 25 °C, 21 % de O₂ y CO₂ a 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$.

3.3.2.2. Fluorescencia modulada de clorofilas (Experimento I y II)

La medida de fluorescencia modulada de las clorofilas se realizaron simultáneamente con la medida de intercambio de gases (en las mismas hojas con las que se trabajaron en el punto anterior), utilizando la cámara de fluorescencia que esta acoplada al cabezal del Li- 6400 (LFC 6400-40) y en las mismas condiciones de luz, temperatura y flujo descritas para las curvas A/C_i .

Los parámetros medidos fueron los siguientes:

Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (F_v/F_m): Medida de la eficiencia máxima del PSII cuando todos los centros están abiertos. Para obtener el valor de este parámetro, la hoja que se utilizó para la medición, se mantuvo en oscuridad durante 30 minutos aproximadamente.

Eficiencia de la captura de la energía de excitación por los centros de reacción abiertos del fotosistema II (F_v'/F_m'): Indica la variación de la eficiencia fotoquímica bajo condiciones limitantes de luz. Los valores varían entre 0 y 1. F_v'/F_m' se calcula mediante la fluorescencia variable ($F_v' = F_m' - F_o'$) y la fluorescencia máxima de la hoja adaptada a la luz (F_m').

3.3.2.3. Contenido de clorofilas (Experimento I, II y III)

El contenido de clorofila es un indicador del estado de las plantas. Las mediciones se realizaron con un equipo portátil de clorofila (Minolta SPAD 502 Meter, Plainfield, IL, USA), en la primera o segunda hoja expandida de la planta cada 15 días. Se realizaron cinco repeticiones por cada hoja evaluada.

3.3.2.4. Eficiencia en el uso del agua (Experimento I y II)

Para estimar la eficiencia en el uso del agua (EUA *intrínseca*) se hizo uso de la metodología de Medrano *et al.* (2007). Para obtener este parámetro, se utilizaron los valores de intercambio de gases que estiman la eficiencia del uso del agua de la hoja, al permitir determinar la transpiración (salida de agua de la planta) y la fotosíntesis neta (entrada neta de CO₂ en las hojas). La eficiencia en el uso del agua a escala foliar es el cociente entre la asimilación de CO₂ y la conductancia estomática:

$$\text{EUA}_{\text{intrínseca}} = A_{\text{sat}} (\mu\text{mol CO}_2) / g_s (\text{mol H}_2\text{O})$$

3.3.2.5. Contenido hídrico relativo (Experimento I y II)

El contenido hídrico relativo (CHR, %), indica el estado de la planta, desde el punto de vista de hidratación celular (Slatyer, 1967).

Este parámetro, se determinó usando la siguiente ecuación:

$$\text{CHR} = (\text{PF} - \text{PS}) / (\text{PFT} - \text{PS}) \times 100$$

Dónde: PF es el peso fresco , PS es el peso seco después de ser secado en una estufa a 60 °C hasta peso constante y, PFT es el peso fresco turgente de la hoja después del equilibrio en agua destilada durante 24 horas a 4 °C en oscuridad.

3.3.3. Análisis de la composición isotópica (Experimento II)

3.3.3.1. Procedimiento de marcaje isotópico con ¹³C

En el Experimento II, las plantas crecieron en el invernadero durante 4 meses. Antes de realizar el marcaje con ¹³C, las plantas se trasladaron a una cámara de ambiente controlado (CONVIRON E15, Controlled Environments Ltd., Winnipeg, Manitoba, Canadá), las cuales se aclimataron durante tres días a las siguientes condiciones: temperatura de 25/18 °C (luz/oscuridad), humedad relativa entre 60 - 70 %, PPFD de 400 μmol m⁻² s⁻¹ durante un período de 16 horas de luz y una concentración de 400 μmol CO₂ mol⁻¹. El tiempo de marcaje se calculó en función de la tasa de asimilación de *A. donax* para cada tratamiento (Nogués *et al.*, 2014). La composición isotópica del aire (δ¹³C) de la cámara CONVIRON antes del marcaje (T0) fue de -11.44 ‰ ± 0.12 ‰.

El marcaje isotópico de C se logró mediante la modificación de la composición isotópica del CO₂ del aire de la cámara con ¹³C. El procedimiento consistió en inyectar dos veces al día la cámara con 50 ml de CO₂ enriquecido al 99 % con ¹³C (Air Liquid, Grigny, Francia; Cambridge Isotope Laboratory,

Estados Unidos). Se tomó el CO₂ enriquecido (¹³C) de la botella con una jeringa de 50 ml (SGE, Ringwood, Australia) y con ayuda de un perfusor (IV Perfusor, Spritzen, Melsungen, Alemania) se dosificó la entrada de ¹³CO₂. Se aplicaron dos inyecciones diarias, en un tiempo total de ocho horas. Transcurrido el tiempo de marcaje para cada tratamiento, las plantas fueron colocadas nuevamente en el invernadero durante siete días. Transcurrido ese tiempo, se realizaron las mediciones del T2.

3.3.3.2. Medidas isotópicas y análisis elemental

Durante los tiempos evaluados (T0, T1 y T2), se determinó la composición isotópica de las siguientes muestras.

Gases

- $\delta^{13}\text{C}$ del CO₂ del aire exterior del invernadero.
- $\delta^{13}\text{C}$ del CO₂ del aire del interior del invernadero.
- $\delta^{13}\text{C}$ del CO₂ del interior de la cámara CONVIRON (antes y durante el marcaje).
- $\delta^{13}\text{C}$ del CO₂ respirado por los diferentes órganos de la planta en la cámara de metacrilato.

Materia orgánica total

- Composición isotópica de ¹³C ($\delta^{13}\text{C}$) en los cuatro órganos de la planta: hoja, tallo, raíz y rizoma ($\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$).
- Composición isotópica de ¹³C ($\delta^{13}\text{C}$) en los azúcares solubles totales ($\delta^{13}\text{C}_{\text{AST}}$).
- Composición isotópica de ¹³C ($\delta^{13}\text{C}$) en el almidón ($\delta^{13}\text{C}_{\text{ALM}}$).

Estos análisis se realizaron en la Unidad de Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas Aplicada de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB).

3.3.3.3. Determinación de la composición isotópica de ^{13}C del CO_2 en el aire

Para obtener el CO_2 respirado en oscuridad de los cuatro órganos (hoja, tallo, raíz y rizoma) evaluados, las plantas fueron adaptadas previamente durante unos 30 - 45 minutos aproximadamente en una habitación oscura. Posterior a eso, cada uno de los órganos, fueron colocados por separado, dentro de una cámara de metacrilato (Nogués *et al.*, 2004). Las raíces y los rizomas se lavaron previamente para eliminar los restos de sustrato y se colocaron dentro de la cámara para poder realizar la medida.

La cámara se conectó de forma paralela, entre la consola y la pinza, al sistema de medida LI- 6400 mediante el tubo de aire de muestra. El nivel de PPFd dentro de la cámara se mantuvo a $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, cubriéndola con una tela negra.

Con el fin de acumular exclusivamente el CO_2 respirado por cada órgano, en primer lugar, se hizo circular a través de la cámara aire libre de CO_2 (llave abierta) hasta reducir la concentración interior próxima a $0 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$, al terminar se cerró el sistema (llave cerrada) y se dejó acumular el CO_2 producido por la respiración en el interior de la cámara durante unos 10 minutos aproximadamente. Cuando la concentración de CO_2 en la cámara llegó a valores entre $600 - 1000 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ se recogió la muestra de aire con una jeringa de 50 ml (SGE International Pty Ltd, Australia).

Cada muestra de aire en la jeringa se depositó en un tubo de 10 ml (Vacutainer®, BD, Plymouth, Reino Unido) limpiado previamente con nitrógeno. Para trasvasar el aire de la jeringa al tubo Vacutainer® se pinchó con una aguja (dispuesta en la jeringa) en el tapón de goma del tubo y se inyectaron unos 10 ml de aire de la muestra, luego con una segunda aguja se

perfora el tapón de goma del tubo para permitir el reemplazo del aire dentro del tubo previamente. A continuación, se procedió a inyectar 40 ml aproximadamente que es el aire restante de la jeringa, provocando así la circulación de la muestra de aire dentro del Vacutainer®. Antes de finalizar la última inyección de los 50 ml se retiró rápidamente la aguja de salida de aire. Los Vacutainer® conteniendo las diferentes muestras, se almacenaron en frío a 4 °C hasta el momento del análisis.

La composición isotópica del CO₂ de las muestras de aire se determinó utilizando la cromatografía de gases (GC-C-IRMS) de flujo continuo.

El CO₂ de las muestras se purificó y separó con un cromatógrafo de gases (6890N, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas de relación isotópica (Delta Plus, Thermo Finnigan, Bremen, Alemania) a través de un interfase de combustión III (Combustion III, Thermo Finnigan, Bremen, Alemania). La columna de capilaridad del cromatógrafo utilizada fue una GS-GasPro (J and W Scientific Inc., Folsom, CA, EE.UU.) de 30 m de longitud x 0.32 mm, por medio de una jeringa (Hamilton, Reno, NV, USA) se aspiraron 0,6 ml de aire de los Vacutainer® y se inyectaron 0.3 ml a la columna, eliminando los primeros 0.2 ml. La inyección se realizó en *split mode* con un flujo de 20 ml min⁻¹. La temperatura del puerto de inyección fue de 220 °C y la presión de 7.8 bares. Se utilizó helio como gas portador a una velocidad de flujo de 1.4 ml min⁻¹.

3.3.3.4. Determinación de la composición isotópica de ¹³C en la materia orgánica total

Para el análisis de MOT en los diferentes órganos de la planta (hoja, tallo, raíz y rizoma), se determinó:

- Las composiciones isotópicas de C ($\delta^{13}\text{C}$).
- Los contenidos en tanto por ciento de C.
- Azúcares
- Almidón

3.3.3.4.1. Obtención de muestras

Las muestras para las determinaciones isotópicas de cada momento, se separaron por órgano (hojas, tallos, raíz y rizoma) y fueron secadas en una estufa a 60 °C hasta alcanzar un peso constante. Posteriormente, se trituraron con un triturador de bolas (Retsch MM301, Haan, Alemania) en los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona y se conservaron en un Eppendorf hasta realizar el procedimiento para la medición de ^{13}C en materia orgánica total (MOT), azúcares solubles totales (AST) y almidón (ALM).

3.3.3.5. Análisis de las muestras

Para el análisis de la MOT se pesaron entre 0.8 y 1 mg de las muestras trituradas en cápsulas de estaño (SYLAB- Elemental Microanalysis, Reino Unido), de 8 x 5 mm de tamaño, con una microbalanza de precisión (Mettler Toledo, España).

El $\delta^{13}\text{C}$ de MOT, AST y ALM, se determinaron en los CCIUB, para lo cual se utilizó un analizador elemental (EA1108, series 1; Carlo Erba Instrumentazione, Milán, Italia) unido a un espectrómetro de masas de relación isotópica (IRMS; Delta C, Finnigan Mat, Bremen, Alemania) que operó de modo continuo para el análisis de la composición isotópica.

Los resultados se expresan como $\delta^{13}\text{C}$ y se calcula de la siguiente fórmula:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = [(R_s/R_{\text{PDB}})-1] \times 1000$$

Dónde: R_s y R_{PDB} son los ratios isotópicos de la muestra y del estándar PDB respectivamente.

El estándar PDB es un fósil belemnita que viene de la formación geológica Pee Dee en Carolina del Sur EEUU (Farquhar *et al.*, 1982; Ghashghaie y Tcherkez, 2013).

Finalmente, las muestras se cargaron en el equipo para el procesamiento de las muestras y fueron ingresando automáticamente al sistema de análisis mediante una rueda giratoria.

3.3.4. Determinaciones bioquímicas (Experimento II)

Se determinó la cantidad de azúcares solubles totales y almidón en las plantas *A. donax* del ecotipo Piccoplant del Experimento II de sequía en invernadero.

Los protocolos utilizados para la extracción de azúcares solubles y almidón se realizaron siguiendo los métodos de Nogués *et al.* (2004) y Richter *et al.* (2009), respectivamente, que se describen a continuación.

3.3.4.1. Extracción de azúcares solubles (Experimento II)

- a) El material vegetal utilizado se trituró con un triturador de bolas (Retsch MM301, Haan, Alemania) hasta obtener un polvo fino (<10 μm). Se pesó aproximadamente 50 mg de cada muestra en un tubo Eppendorf. Se añadió 1 ml de agua destilada, se agitó en un vórtex durante 1 minuto y se mantuvo en hielo durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, se volvió a agitar en un vórtex y se mantuvo 10 minutos más en hielo. Pasado este tiempo, se centrifugó a 12000 g a 5 °C durante 5 minutos.
- b) Se pipeteó el sobrenadante a un nuevo tubo. El *pellet* se guardó en el congelador para el posterior análisis de almidón (Apartado 3.3.4.2).
- c) Los tubos con el sobrenadante se pusieron en el calentador a 100 °C durante 3 minutos para desnaturalizar las proteínas y se mantuvieron durante 5 - 10 minutos en hielo. Por último, se centrifugó a 12000 g a 5 °C durante 5 minutos, se decantó el

sobrenadante en un nuevo tubo y se conservó en el congelador hasta su utilización.

- d) Para analizar la composición isotópica de los azúcares solubles, se evaporaron 200 ml aproximadamente de cada una de las muestras en una estufa a 40 °C durante 6 horas aproximadamente en las cápsulas de estaño. Las cápsulas una vez cerradas se colocaron en una placa Elisa y se almacenaron en un desecador hasta su posterior análisis.

3.3.4.2. Extracción de almidón (Experimento II)

El protocolo de almidón se divide en tres pasos:

- a) Eliminación de pigmentos:** Las muestras obtenidas en el Apartado 3.3.4.1, se mantuvieron en hielo, se añadió 1 ml de etanol a cada tubo y se agitó en un vórtex. Los tubos se incubaron en el calentador a 70 °C durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó a 12000 g a 5 °C durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Este paso se repitió hasta que el sobrenadante fue incoloro.
- b) Solubilización y floculación del almidón:** Se añadió 1 ml de HCl 6 M y se agitó en el vórtex, la muestra se transfirió a un tubo Falcon de 20 ml. Se agregó 1 ml adicional de HCl a los Eppendorf de 1.5 ml y se transfirió el contenido a los tubos Falcon de 20 ml. Los tubos de 20 ml se mantuvieron a 5 °C durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se centrifugaron a 12000 g a 5 °C durante 20 minutos. Se pipeteó el sobrenadante y se transfirió a tubos Falcon de 50 ml (pesados previamente). Se añadió 2 ml de HCl al *pellet* del tubo de 20 ml y se volvió a incubar a 5 °C durante 1 hora. Se centrifugaron nuevamente las muestras a 12000 g a 5 °C durante 20 minutos y

se pipeteó el sobrenadante y se transfirió al tubo de 50 ml. Finalmente se agregaron 16 ml de metanol y se mantuvieron los tubos de 50 ml a 5 °C durante la noche.

- c) **Liofilización y estimación de la cantidad de almidón:** Se centrifugaron los tubos de 50 ml a 12000 g a 5 °C durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Las muestras se llevaron al liofilizador con trampa para ácidos (Alpha 1-4 LDplus, Christ, Osterode am Harz, Alemania) durante 24 horas. Pasado este tiempo, los tubos se volvieron a pesar para determinar la cantidad exacta de almidón en cada una de las muestras.
- d) Para analizar la composición isotópica del almidón, se pesaron 200 mg aproximadamente de cada muestra. Utilizando las mismas cápsulas que en el caso anterior. Las cápsulas una vez cerradas se colocaron en una placa Elisa y se almacenaron en un desecador hasta su posterior análisis.

3.3.5. Análisis moleculares

Para los análisis moleculares, se utilizaron los cinco ecotipos de las plantas *A. donax* de invernadero (Tabla 3.1). Además se realizó una prueba adicional con muestras del Experimento I (Piccoplant).

3.3.5.1. Extracción de ADN genómico

El primer paso para iniciar los análisis moleculares fue la extracción de ADNg de *A. donax*. Para ello, se cortaron hojas jóvenes de los ecotipos empleados para cada experimento en tubos Falcon (50 ml). Las muestras fueron liofilizadas (Alpha 1-4 LDplus, Christ, Osterode am Harz, Alemania) durante 72 - 96 horas y se conservaron de esta manera hasta su utilización.

Procedimiento

- a) Se trituraron las muestras de forma manual con nitrógeno líquido (cada muestra compuesta por hojas dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 ml).
- b) Se agregó 500 - 1000 μ l de buffer de lisis (previamente calentado a 65 °C durante 5 minutos). Las muestras se incubaron a 65 °C por 5 minutos y se agregó a cada una 10 μ l de RNAsa A. Luego, cada muestra se incubó durante 80 minutos.
- c) Se centrifugaron los tubos a 12000 rpm durante 10 minutos (Eppendorf Centrifuge 5424, Hamburgo, Alemania).
- d) Luego, para extraer el ADNg se utilizó el Thermo Scientific KingFisher Flex (Figura 3.5 A) y el Plant DNA Kit (Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones adjuntas. Por último, se colocaron las muestras en unas placas especiales del Kit (Figura 3.5 B, C) en la máquina Thermo Scientific KingFisher Flex y luego de 47 minutos se obtuvo el ADN extraído.

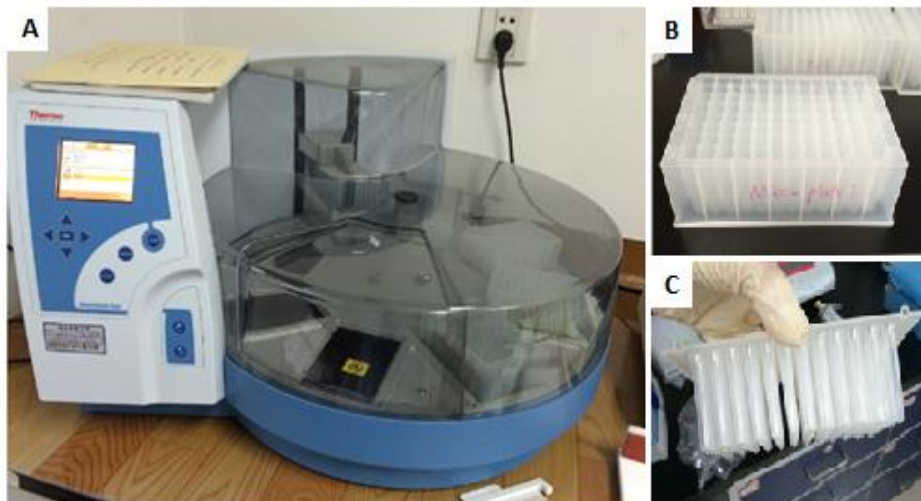


Figura 3.5. A) Equipo para extracción de ADNg (Thermo Scientific KingFisher) del laboratorio National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement - Huazhong Agricultural University. B-C) Placas especiales para la extracción de ADN.

3.3.5.2. Técnicas básicas para el análisis de ADN

Para verificar la calidad, pureza e integridad del ADNg extraído, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa (Apartado 3.3.5.2.2), se verificó la concentración de ADNg con un fluorómetro como se explica en el Apartado 3.3.5.2.1 y, además se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de fragmentos de ADN (Apartado 3.3.5.2.3).

3.3.5.2.1. Fluorometría

La fluorometría es uno de los métodos utilizados para cuantificar ADN. En esta Tesis, se usó el Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Massachusetts, Estados Unidos; Figura 3.6), que es un equipo para la cuantificación de ADN, ARN y proteínas, usando la alta sensibilidad y precisión de los ensayos de cuantificación de este equipo (Figura 3.6). El uso de los tintes selectivos para ADN de doble cadena, ARN y proteínas minimiza los efectos de los contaminantes presentes en la muestra que afectan a la cuantificación.

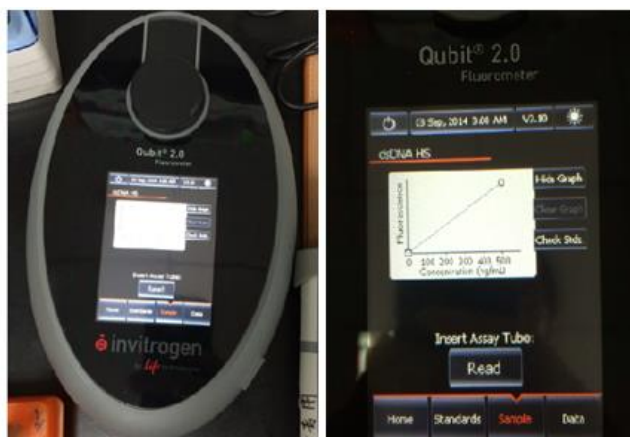


Figura 3.6. Fluorómetro Qubit® 2.0 del laboratorio *National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement - Huazhong Agricultural University*.

Preparación de muestras

Para la cuantificación de ADNg, se utilizó el Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Massachusetts, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se rotularon tubos pequeños para cada muestra y se preparó el mix del kit. Se colocó 199 μ l de mix en cada tubo y 1 μ l de cada muestra. Se incubó en oscuridad durante 2 minutos y se leyó la concentración en la máquina.

Para la construcción de librerías NGS (Apartado 3.3.5.3.4) se diluyeron las muestras de ADNg a una concentración de 10 ng en un volumen de 40 μ l.

3.3.5.2.2. Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa permite separar, visualizar y purificar fragmentos de ADN según su tamaño al ser sometidos a un campo eléctrico de fuerza y dirección constante. En estas condiciones, las moléculas de ADN (cargadas negativamente) migran hacia el electrodo positivo. El porcentaje de agarosa del gel depende del tamaño de las moléculas a separar, se usa menor concentración para separar moléculas más grandes (Sambrook y Russel, 2001).

Para visualizar el ADN, se utilizó un colorante fluorescente de ácidos nucleicos (Gelview, BioTeke Corporation, Beijing, China). Gelview puede teñir ADN de cadena doble, cadena simple o ARN en geles de agarosa o poliacrilamida, tiene el mismo espectro de absorción (300 nm aproximadamente) y emisión (600 nm aproximadamente) que el EtBr y puede sustituirlo satisfactoriamente.

Dado que la intensidad de fluorescencia es proporcional a la masa total de ADN, la cantidad de ADN de una muestra se estima por comparación con muestras de concentración conocida.

Preparación del gel de agarosa

- a) La agarosa se disolvió por calor (microondas) en el volumen correspondiente de tampón de electroforesis Tris-acetato/EDTA (TAE) hasta obtener una solución transparente. Se añadieron 5 µl de GelView por 50 ml de solución (0.1 µl/ml) y se agitó suavemente.
- b) La mezcla se vertió en el portageles al que se había incorporado el peine para formar los pocillos. Se dejó solidificar durante unos 45 minutos a temperatura ambiente y luego se retiró el peine.
- c) El portageles con el gel, se colocó en la cubeta de electroforesis situando los pocillos hacia el electrodo negativo. Se añadió TAE hasta cubrir completamente el gel.

Preparación y carga de las muestras, marcador de peso molecular, electroforesis y visualización de las bandas

A cada muestra de ADN se le añadió 1/3 de su volumen de tampón de carga 6X (Gel loading buffer solution, Takara, Kioto, Japón), se mezcló y se recuperó todo el volumen mediante una breve centrifugación.

El marcador de peso molecular BM 2000 DNA Marker (Biomed, Beijing, China) se diluyó en tampón de carga 6x según las instrucciones del fabricante, se mezcló bien y recuperó todo el volumen por una breve centrifugación.

Las muestras y el marcador de peso molecular se cargaron en los pocillos del gel y la electroforesis se realizó a 90 - 120 V durante 25 - 80 minutos. La separación de los fragmentos de ADN, se siguió por el desplazamiento del azul de bromofenol en el gel.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se observó en un transiluminador (BIORAD Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ Imaging System, California, Estados Unidos) para visualizar las bandas y obtener la fotografía correspondiente.

3.3.5.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica para amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ADN mediante la extensión simultánea de cebadores (oligonucleótidos sintéticos) de secuencia complementaria a las cadenas opuestas (+ y -) de ADN (Mullis *et al.*, 1986). La PCR se basa en la actividad natural de las ADN polimerasas de duplicar el ADN, pero para ello, emplea dos cebadores, cada uno complementario a una de las dos cadenas de ADN obtenidas por desnaturalización por calor. El resultado es la síntesis de una región del ADN acotada por los dos cebadores. Esta reacción requiere ADN molde, *Taq* polimerasa (enzima obtenida de *Thermus aquaticus*) termoestable, tampón con Mg^{2+} , cebadores y desoxinucleótidos (dNTPs; Taylor, 1991).

Un ciclo de replicación típico incluye 3 pasos:

- ✓ **Desnaturalización** de la doble cadena de ADN por choque térmico (comúnmente 94 °C).
- ✓ **Hibridación** de los cebadores con la cadena complementaria de ADN. La temperatura de hibridación se selecciona teniendo en cuenta la temperatura media de fusión (T_m) de los cebadores y suele estar entre los 45 - 65 °C.
- ✓ **Elongación** de los fragmentos de ADN en sentido 5' → 3' a partir de los cebadores, para obtener la cadena complementaria de la que ha servido como molde. La temperatura dependerá de la *Taq* polimerasa utilizada (comúnmente 68 o 72 °C).

El ciclo se repite 'n' veces. Las cadenas sintetizadas en un ciclo actúan como molde en el siguiente, lo que permite una amplificación exponencial del ADN. El número de ciclos requerido para una amplificación óptima varía

dependiendo de la cantidad de ADN inicial y de la eficiencia de cada paso de amplificación (20 a 35 ciclos).

En este trabajo, se realizaron PCRs convencionales que se usaron en la construcción de librerías *Next Generation Sequencing* NGS (Apartado 3.3.5.3.4).

Las PCRs se realizaron en un volumen de 50 μ l con un termociclador (BIORAD, T100™ Thermal Cycler, California, Estados Unidos; Figura 3.7) y se continuó con el programa de amplificación consistente en:

Protocolo de PCR:

- **1 ciclo** 5 minutos a 72 °C
 - **1 ciclo** 30 segundos a 98 °C
 - **18 ciclos** 10 segundos a 98 °C
 30 segundos a 65 °C
 25 segundos a 72 °C
 - **1 ciclo** 5 minutos a 72 °C
- Enfriar y mantener a 4 °C



Figura 3.7. Termociclador T100™ Thermal Cycler, BIORAD.

3.3.5.3. Protocolo para el *Genotyping by Sequencing* (GBS)

El protocolo usado para el GBS es el propuesto por Elshire *et al.* (2011), que se describirá a continuación.

3.3.5.3.1. Enzima de restricción (RE)

La enzima de restricción usada fue la *ApeKI*, que es una endonucleasa de restricción de tipo II, que reconoce una secuencia degenerada de 5 bp (GCWGC, donde W es A o T), creando un extremo cohesivo 5' de 3 pares de bases (pb), tiene relativamente pocos sitios de reconocimiento en las clases principales de retrotransposones de maíz y es parcialmente sensible a la metilación. Además, no corta la fracción principal repetitiva del genoma que es de importancia crítica. El uso de una RE que genere extremos cohesivos (que comprende más de un nucleótido) es necesario para la posterior ligación del adaptador para insertar ADN (Elshire *et al.*, 2011).

3.3.5.3.2. Cebadores

En la Tabla 3.4, se indica la nomenclatura, la secuencia, el número de nucleótidos, el porcentaje de desoxiguanosina-5'-fosfato y desoxicitosina-5'-fosfato (G+C), y el origen de los cebadores usados en este trabajo.

Los cebadores utilizados fueron los propuestos por Elshire *et al.* (2011): Cebador-*F* y Cebador-*R* con 58 y 61 nucleótidos respectivamente, porcentaje de G + C similar e igual o superior al 50 % y no forman dímeros (no deben ser complementarios especialmente en el extremo 3').

Estos cebadores contienen secuencias complementarias para la amplificación de fragmentos de restricción con adaptadores, uniendo los productos de PCR con los oligonucleótidos que cubren la celda de flujo de secuenciación del secuenciador (HiSeq 2000 platform, Illumina, California, Estados Unidos) y el cebado de las reacciones de secuenciación de ADN posterior.

Tabla 3.4. Secuencia de los cebadores empleados en la amplificación de fragmentos de *A. donax* publicados por Elshire *et al.* (2011). Se incluye el nombre, la secuencia en sentido 5'→3', el número de nucleótidos (N° nt) y el % de desoxiguanosina-5'-fosfato y desoxitocitocina-5'-fosfato (% GC).

Nombre	Secuencia (5'→3')	N° nt	% GC
Cebador -F	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTT	58	51.7
	CCCTACACGACGCTCTTCCGATCT		
Cebador -R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGG	61	55.7
	CATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT		

3.3.5.3.3. Adaptadores

Se utilizaron dos tipos de adaptadores en este trabajo, el adaptador de código de barras y el adaptador común.

Adaptador de código de barras

El adaptador de código de barras, termina con una secuencia de entre 4 a 8 bp llamada “código de barras” en el extremo 3' de la cadena principal y, un pequeño extremo cohesivo en el final de la cadena complementaria (extremo 5'), que a su vez es complementaria al extremo cohesivo generado por la *ApeKI* (Figura 3.8).

Las secuencias de los dos oligonucleótidos que comprenden el adaptador de código de barras son:

5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTxxxx

5'-CWGyyyyAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT.

Donde “xxxx” e “yyyy” expresan el código de barras y su complementario respectivamente

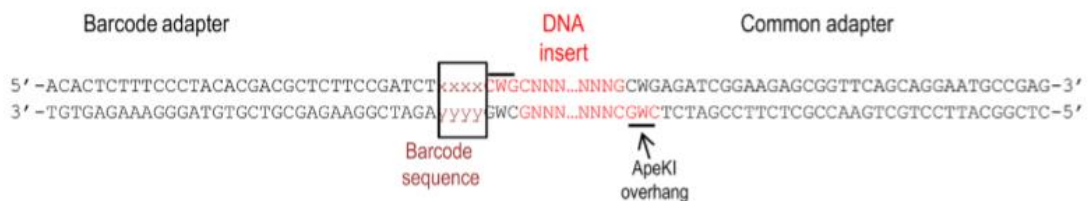


Figura 3.8. Posición de las secuencias de doble cadena del adaptador de código de barras y el adaptador común, en relación al ADN inserto (Elshire *et al.*, 2011)

Adaptador común

El segundo tipo de adaptador, es el adaptador común que solo es compatible al extremo cohesivo generado por la *ApeKI* (Figura 3.1) y son los siguientes:

5'-CWGAGATCGGAAGAGCGGTTCAGCAGGAATGCCGAG

5'-CTCGGCATTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT.

Los adaptadores se diseñaron de modo que el sitio de reconocimiento de *ApeKI* no ocurriera en cualquier secuencia del adaptador y no se regenerasen tras la ligación con el ADN genómico.

Código de barras

Un conjunto compatible de 96 códigos de barras son los propuestos por Elshire *et al.* (2011) y son usados en el presente trabajo para la secuenciación múltiple (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Secuencias de códigos de barra (4-8 bp) para los adaptadores *ApeKI*. Elshire *et al.* (2011).

CTCC	TTCTC	TCGTT	CTATTA	AATATGC	TGCAAGGA
TGCA	AGCCC	GGTTGT	GCCAGT	ACGTGTT	TGGTACGT
ACTA	GTATT	CCAGCT	GGAAGA	ATTAATT	TCTCAGTC
CAGA	CTGTA	TTCAGA	GTACTION	ATTGGAT	CCGGATAT
AACT	ACCGT	TAGGAA	GTTGAA	CATAAGT	CGCCTTAT
GCGT	GCTTA	GCTCTA	TAACGA	CGCTGAT	AACCGAGA
CGAT	GGTGT	CCACAA	TGGCTA	CGGTAGA	ACAGGGAA
GTAA	AGGAT	CTTCCA	TATTTTT	CTACGGA	ACGTGGTA
AGGC	ATTGA	GAGATA	CTTGCTT	GCGGAAT	CCATGGGT
GATC	CATCT	ATGCCT	ATGAAAC	TAGCGGA	CGCGGAGA
TCAC	CCTAC	AGTGGA	AAAAGTT	TCGAAGA	CGTGTGGT
TGCGA	GAGGA	ACCTAA	GAATTCA	TCTGTGA	GCTGTGGA
CGCTT	GGAAC	ATATGT	GAACTTC	TGCTGGA	GGATTGGT
TCACC	GTCAA	ATCGTA	GGACCTA	ACGACTAC	GTGAGGGT
CTAGC	TAATA	CATCGT	GTCGATT	TAGCATGC	TATCGGGA
ACAAA	TACAT	CGCGGT	AACGCCT	TAGGCCAT	TTCCTGGA

Para el cálculo del número de *código de barras* se usó la siguiente información obtenida del grupo de investigación del Dr. Jianbing Yan:

1 carril = 18.75Gb, y se necesitó 0.5Gb/muestra. Por tanto en el trabajo se usaron 33 códigos de barras.

3.3.5.3.4. Construcción de librerías *Next Generation Sequencing* (NGS)

Plaqueado de los adaptadores y las muestras de ADN: Los adaptadores de código de barra (incluyendo el código de barras) y los adaptadores comunes en cada pocillo de la placa de Elisa (proporción 1:1, volumen final 6 μ l, \sim 0.06 pmol por cada adaptador). Como los códigos de barra son diferentes unos a otros, se colocaron independientemente uno a uno en cada uno de los pocillos. Se dejó secar la mezcla y luego se agregó las muestras de ADN (10 ng / 40 μ l) en cada uno de los pocillos.

Digestión del ADN usando *ApeKI*: Se agregó 20 μ l de *ApeKI* (R0643L, New England Biolabs, Massachusetts, Estados Unidos) a la placa de Elisa y se digirió durante 2 horas a 75 °C.

Ligación de los adaptadores: Se agregó 30 μ l de T4 DNA ligasa (M0202L, New England Biolabs, Massachusetts, Estados Unidos) y se activó la enzima a 22 °C durante 60 minutos y pasado el tiempo se desactivó a 65 °C durante 30 minutos.

Pool DNAs y clean up: Se combinaron los *sets* de muestras de ADN digerido. Se tomaron 5 μ l de cada uno de los pocillos y se colocaron en un tubo limpio de 1.5 ml, obteniendo así un producto mixto. Estas muestras se purificaron utilizando el QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

PCR: Con los productos obtenidos en el paso anterior, se realizó la PCR en un volumen final de 50 μ l que contenía: 6 μ l de la muestra de ADN, 25 μ l de *Taq* Master Mix (M0270S, New England Biolabs, Massachusetts, Estados Unidos),

1 µl de Cebador-F, 1 µl de Cebador -R y 17 µl de agua. El protocolo de PCR utilizado se detalla en el Apartado 3.3.5.2.3.

Clean up PCR: Se realizó una electroforesis de prueba con 5 µl de la muestra (40 minutos, 120 V) y si las bandas se visualizaban bien, se realizó una nueva electroforesis con 45 µl de la muestra (45 minutos, 90 V) ver Apartado 3.3.5.2.2. Finalizado el tiempo de electroforesis se cortaron las bandas del gel de agarosa, se pesaron y se utilizó el MinElute® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los ADN calificados fueron utilizados para la construcción de la biblioteca de secuenciación GBS. A continuación, las bibliotecas GBS se secuenciaron en la plataforma Illumina HiSeq 2000.

Las muestras de ADN se digirieron y se secuenciaron usando GBS. Los *inputs* de UNEAK son archivos Illumina Qseq o Fastq. Todas las lecturas son computacionalmente recortadas a 100 pb (Figura 3.9 A).

La secuenciación se realizó en el modo *single-end* con 100 pb de longitud. Finalmente, se aprovechó el *Universal Network Enabled Analysis Kit* (UNEAK) para encontrar los SNP basados en los datos de secuenciación.

3.3.5.3.5. Tags y Filtering raw sequence data

Las secuencias anteriores fueron ordenadas de tal forma que si eran idénticas se clasificaron como un *tag* (Figura 3.9 B).

El número secuencias que conforman un *tag* debe ser entre ≥ 5 y ≤ 100 . Los *tags* que contengan menos de 5 secuencias, se supone que son el resultado de errores de secuenciación y los mayores de 100 secuencias puede ser causado por el potencial de secuenciación repetitiva, por tanto deben ser eliminados como filtro inicial (Lu *et al.*, 2013).

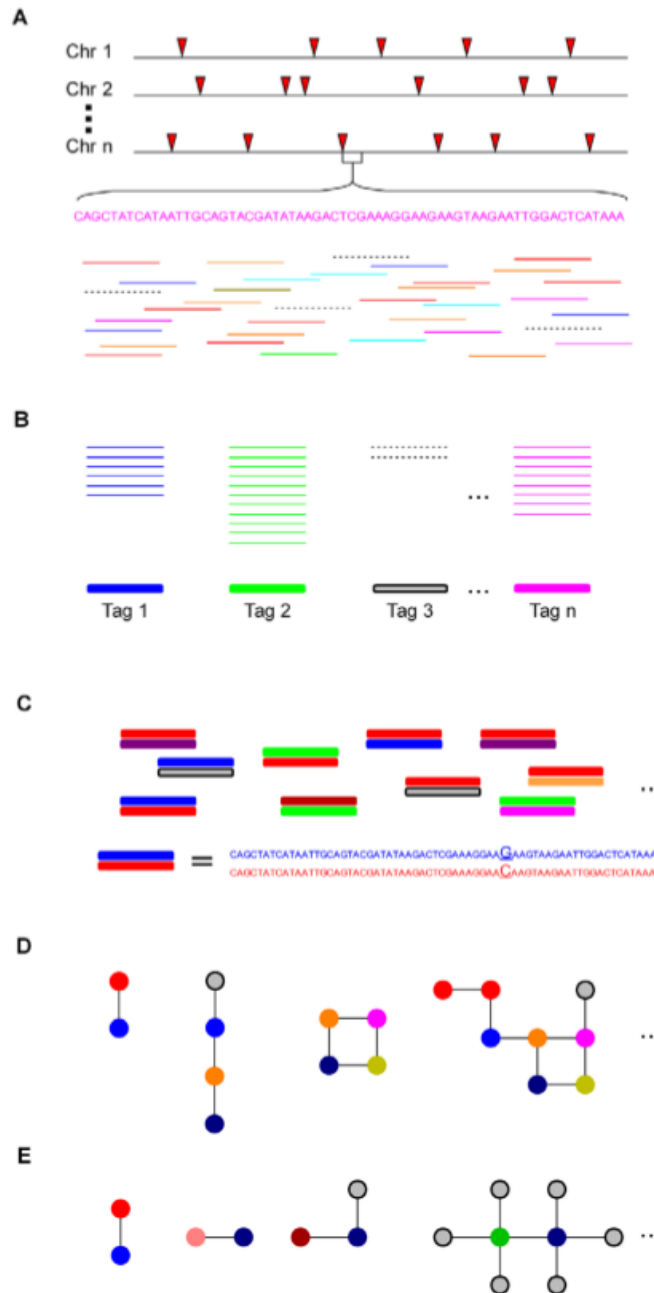


Figura 3.9. (A) Múltiples muestras de ADN se digirieron y se secuenciaron usando GBS (las flechas rojas representan los sitios de corte). Todas las lecturas son computacionalmente recortadas a 100 pb. Las líneas de colores sólidos representan lecturas libre de errores ("reales"), mientras que las líneas discontinuas son lecturas que contienen uno o más errores de secuenciación. (B) Las lecturas idénticas se clasifican como un *tag*. Las barras de colores son etiquetas reales, mientras que la barra sombreada es una etiqueta de error. (C) La alineación de pares de *tags* se realizan para encontrar pares de *tags* que difieren en sólo un único pb. (D) Topología de las redes de *tags*. Los círculos de colores son etiquetas reales, mientras que los círculos sombreados son etiquetas de error. Líneas (bordes) se dibujan solamente entre etiquetas que difieren por un solo desajuste de pb. (E) Sólo líneas recíprocas entre pares de *tags* reales se mantienen como SNPs (Lu *et al.*, 2013).

3.3.5.3.6. Alineamiento de secuencias de ADN

Finalizado el filtrado, las secuencias se analizan en pares para encontrar por parejas de *tags* diferentes en un solo pb (Figura 3.9 C). Esta diferencia en una única base, es candidato a SNP. Debido a la complejidad del genoma, muchos pares de *tags* forman redes (Figura 3.9 D). Un filtro de red (Apartado 3.3.5.3.7) es necesario para descartar redes complicadas que son usualmente mezcla de repeticiones, parálogos y errores de *tags*.

Después de la aplicación del filtro de red, las redes restantes se componen de pares de etiquetas recíprocas, que luego pueden ser utilizados como SNP *calling* (Figura 3.9 E).

3.3.5.3.7. Network filter

Para tener en cuenta la secuencia de errores, se introdujo un parámetro llamado tasa de tolerancia de error (ETR) para mejorar el filtro de red inicial. Sin esta característica (ETR = 0), la secuencia de errores puede tener un impacto negativo considerable en el número de SNPs encontrados. El valor de la ETR usado en este trabajo es ≥ 0.3 , los *tags* que no cumplan con este requisito serán eliminados (Lu *et al.*, 2013).

La fórmula para hallar la ETR es la siguiente:

$$c1 / (c1 + c2) < ETR.$$

Para dos etiquetas (*tag 1* y *tag 2*) con un desajuste de 1 bp y recuentos de lectura $c1$ y $c2$ respectivamente (si, $c1 / (c1 + c2) < ETR$), entonces *tag 1* se supone que es un error de secuenciación de *tag 2*.

De esta manera se eliminan los *tags* con errores, mientras que los *tags* reales son entonces identificados como SNPs.

3.3.5.4. Construcción de árboles filogenéticos

Con los SNPs obtenidos de las muestras analizadas, se construyó un *Neighbour-Joining tree* usando el programa Mega 4.0.2 (Arizona, Estados Unidos) para revelar la relación filogeográfica entre los ecotipos. Además, para evaluar la solidez de los árboles, 1000 repeticiones de *bootstraps* se realizaron utilizando MEGA (Tamura *et al.*, 2011) en un rango del de 0 – 100 %. Este valor nos indica que cuanto más cercano al 100 % estén nuestros resultados, serán más fiables. Los árboles filogenéticos, podrían proporcionar la información sobre la relación entre cada clon para el análisis de subestructura en esta población.

3.3.5.5. Conteo de cromosomas

El cultivo de las raíces para el conteo de cromosomas, se realizó en condiciones de invernadero. Para ello, se cortaron tallos de aproximadamente 10 cm de largo conteniendo un nudo y se colocaron en macetas de 300 ml con arena gruesa. Se agregó solución nutritiva Hoagland y se dejaron durante tres semanas en cámara (CONVIRON Model 110-E15, Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canadá) las condiciones de crecimiento fueron: temperatura 25/18 °C (día/noche), HR de 60 % y fotoperiodo de 16 horas).

Pasado el tiempo de crecimiento, las muestras fueron retiradas del sustrato de arena y se lavaron para quitar el exceso de sustrato (Figura 3.10 A). Las puntas de las raíces, dónde se encuentra la mayor actividad de división celular (zona meristemática), fueron cortadas para iniciar el trabajo.

Se siguió el método de Haddadchi *et al.* (2013), que se describe a continuación:

Las puntas de las raíces (Figura 3.10 B) se colocaron en una solución de 8-hidroxiquinolina 2 mM durante 3 - 5 horas. Se fijó en etanol absoluto y ácido acético glacial (3:1) por al menos 24 horas a 4 °C. Se maceró en ácido clorhídrico 1 mM a 60 °C durante 15-20 minutos, luego se lavó y se suspendió en ácido acético 45 % por 10 minutos. Después de la suspensión, las puntas

de las raíces se colocaron en un portaobjetos y se tiñeron con una gota de carbol-fucsina 0.5 % y se aplastó la raíz usando un cubre objeto.



Figura 3.10. (A) Raíces de *A. donax* después de lavarlas con agua corriente. (B) Puntas de raíces cortadas para iniciar el protocolo para el conteo de cromosomas.

Se contó un total de 50 células (cinco células * cinco raíces * dos plantas) de cada uno de los cinco ecotipos, mediante el microscopio Leitz DMIRB (Chicago, Estados Unidos). Para contar los cromosomas se usó el programa Fiji (Image J, Wisconsin, Estados Unidos) y, para facilitar el conteo se tomaron fotos con la cámara Leica DFC 360 FX (Chicago, Estados Unidos). No se pudo determinar un número exacto de cromosomas debido al pequeño tamaño y alto número de los mismos, por ello se obtuvo el promedio por ecotipo para estimar el número de cromosomas.

3.3.6. Análisis estadístico

Las medias y errores estándar (SE) para cada parámetro medido se representaron gráficamente o en tablas y se sometieron a pruebas estadísticas con el software SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

El análisis de los datos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Las variables dependientes fueron verificadas por la normalidad y homocedasticidad. Cuando una prueba en particular fue significativa, se compararon las medias mediante el test de comparación múltiple de Duncan.

Las diferencias se consideraron significativas a un nivel de probabilidad $P \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento I: Estudio del efecto del riego en plantas de *Arundo donax*

L. en condiciones de campo

4.1.1. Medidas de crecimiento

A. donax no presentó diferencias entre tratamientos en un mismo momento de medición. Sin embargo, si hubo diferencia entre tiempos, en relación a la altura. En T_0 y T_1 , los tratamientos R y S no mostraron diferencias significativas y, ambos presentaron una altura máxima de 1.6 m y 2.4 m en el T_0 y T_1 , respectivamente. Sin embargo, al comparar entre tiempos (T_0 y T_1) se puede observar un crecimiento moderado donde sí se observan diferencias significativas (Tabla 4.1).

La producción de materia seca de la parte aérea de *A. donax* solo pudo ser medida al final del experimento por ser una técnica destructiva. Para el tratamiento S se obtuvo un 30.8 % menos producción de materia seca, comparado con tratamiento R, presentando diferencias significativas entre ambos tratamientos (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Altura (m) de las plantas y peso seco (g) de la parte aérea (PA) de *A. donax* crecidas en condiciones de regadío (R) y secano (S), medida en diferentes momentos (T_0 : primavera; T_1 : principio de verano; Tf: Tiempo final) de 2013. Los valores representan la media \pm SE de cuatro réplicas ($n=4$). Letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ($P<0.05$) entre tratamientos dentro de un mismo tiempo según el Test de Duncan.

Parámetro	Tiempo	Tratamiento	Resultado
Altura (m)	T_0	R	1.6 \pm 0.1 Aa
	T_0	S	1.6 \pm 0.1 Aa
	T_1	R	2.4 \pm 0.1 Bb
	T_1	S	2.4 \pm 0.1 Bb
Peso seco (g)	Tf	R	5727.4 \pm 309.2 A
	Tf	S	3963.8 \pm 222.8 B

4.1.2. Caracterizaciones fisiológicas

4.1.2.1. Intercambio de gases

Desde un punto de vista general, las plantas del tratamiento R tuvieron un mejor comportamiento fisiológico respecto a las plantas del tratamiento S.

La tasa de asimilación neta de CO₂ a saturación de luz (A_{sat}), en el tratamiento R mostró una disminución de este parámetro entre T₀ y T₁ (cercasas al 25 %), aunque no se encontraron diferencias significativas en T₀. Sin embargo, sí encontraron diferencias significativas en el tratamiento S, donde A_{sat} disminuyó cerca de un 40 % entre T₁ y T₀ (Figura 4.1).

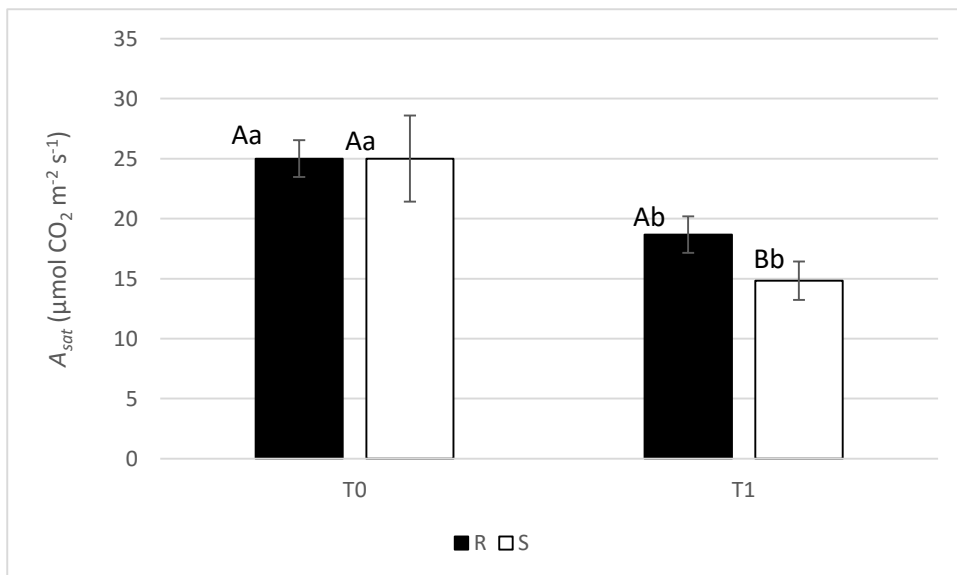


Figura 4.1. Tasa de asimilación neta de CO₂ a saturación de luz (A_{sat}) en T₀ (primavera) y T₁ (principio de verano). Los valores representan la media \pm SE de tres réplicas (n=3). R (tratamiento de regadío), S (tratamiento de secano). Letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.

La tasa fotosíntesis neta máxima (A_{max}), mostró una disminución significativa en ambos tratamientos R (35 %) y S (40 %) a lo largo del experimento (Figura 4.2). Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre tratamientos para un mismo momento de medición.

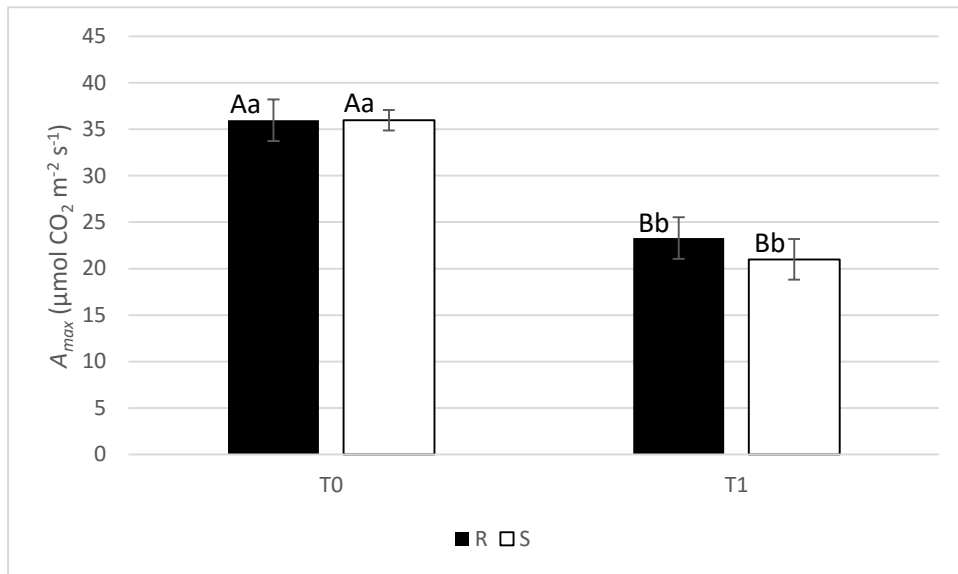


Figura 4.2. Tasa de fotosíntesis neta máxima (A_{max}) en T₀ (primavera) y T₁ (principio de verano). Los valores representan la media \pm SE de tres réplicas (n=3). R (tratamiento de regadío), S (tratamiento de secano). Letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.

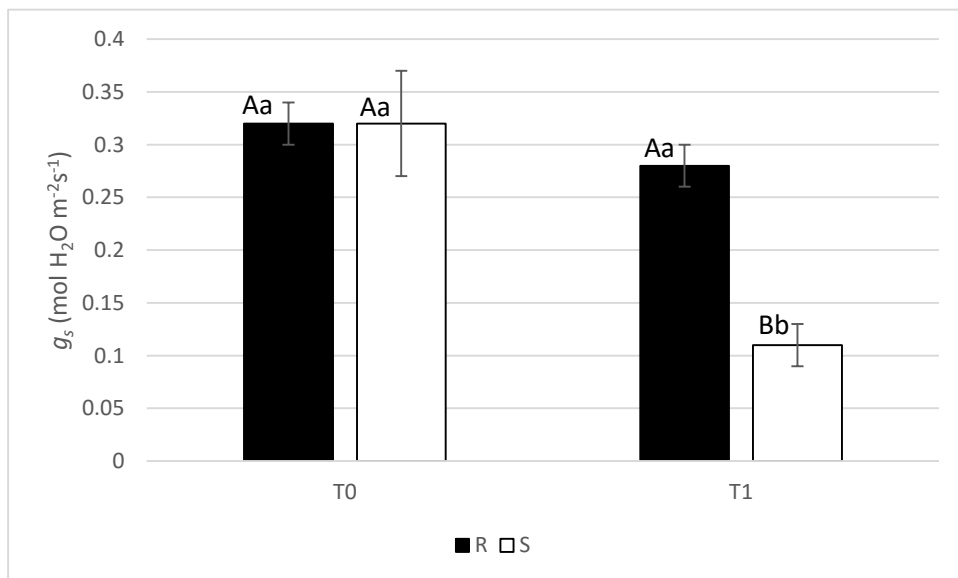


Figura 4.3. Conductancia estomática (g_s) en T₀ (primavera) y T₁ (principio de verano). Los valores representan la media \pm SE de tres réplicas (n=3). R (tratamiento de regadío), S (tratamiento de secano). Letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.

La conductancia estomática (g_s), en el tratamiento R no mostró diferencias significativas del T₀ al T₁ (aunque disminuyó en un 12 %). Sin embargo, sí se observaron diferencias muy marcadas en el tratamiento S entre los dos tiempos, cercanas al 65 % (Figura 4.3).

La velocidad máxima de carboxilación ($V_{c,max}$) en el tratamiento R se presentó estable, sin mostrar diferencias significativas entre T₀ y T₁. Sin embargo, como en los casos anteriores, se observaron diferencias muy marcadas en el tratamiento S entre los dos tiempos, al aumentar un 60 % la $V_{c,max}$ (Figura 4.4).

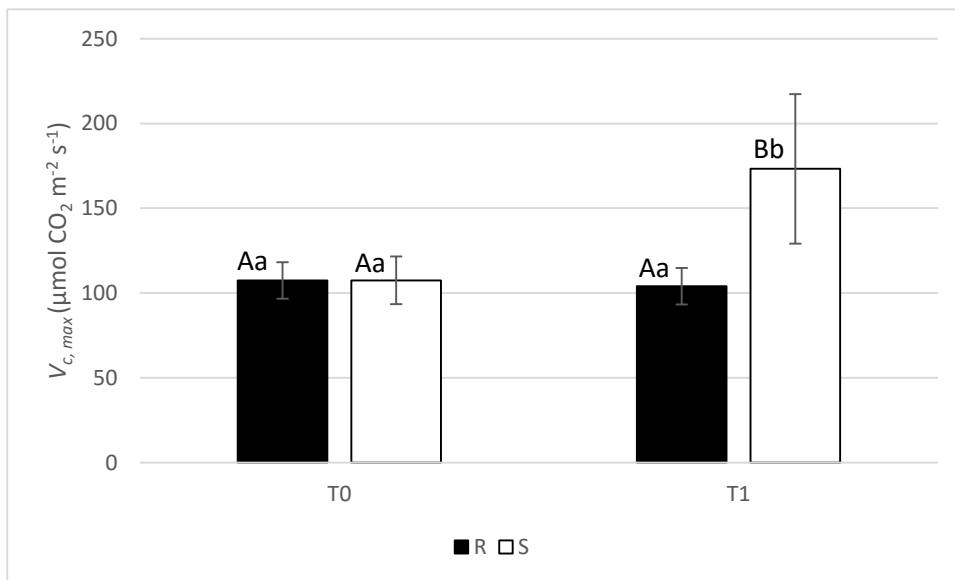


Figura 4.4. Velocidad de carboxilación ($V_{c,max}$) en T₀ (primavera) y T₁ (principio de verano). Los valores representan la media \pm SE de tres réplicas (n=3). R (tratamiento de regadío), S (tratamiento de seco). Letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.

La tasa de transporte de electrones (J_{max}) siguió la tendencia de disminución en los tratamientos R (30 %) y S (40 %) a lo largo del experimento (Figura 4.5), encontrándose diferencias significativas en función del tiempo. Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre tratamientos para un mismo momento de medición.

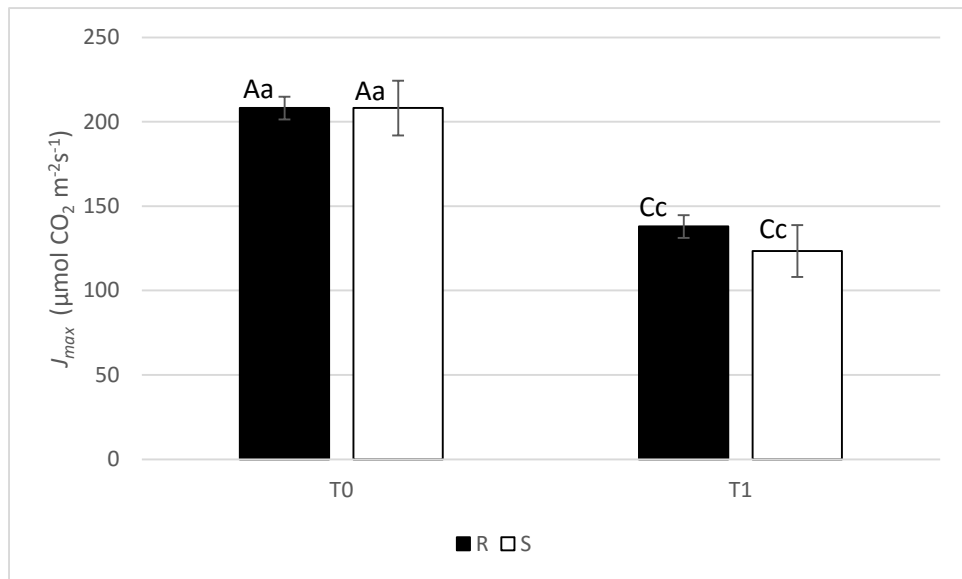


Figura 4.5. Tasa de transporte de electrones (J_{max}) en T₀ (primavera) y T₁ (principio de verano). Los valores representan la media \pm SE de tres réplicas (n=3). R (tratamiento de regadío), S (tratamiento de secano). Letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.

4.1.2.2. Fluorescencia modulada de clorofilas

Se obtuvieron valores de rendimiento cuántico máximo del PSII (F_v/F_m), medidos en la oscuridad, con un valor aproximado de 0.8. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre tratamientos evaluados en un mismo momento de medición y a su vez entre tiempos para un mismo tratamiento (Tabla 4.2).

En general, los datos de respuesta de fotosíntesis a luz absorbida ($A/PARI$; Anexo 8.1) mostraron un aumento en las tasas de fotosíntesis neta a medida que se incrementó la cantidad de la luz hasta $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, siendo el T₀ el que presentó mayores valores de asimilación de CO₂. En el T₁ y condiciones de secano hubo menores tasas de asimilación, disminuyendo en un 30 % aproximadamente con respecto al regadío. La eficiencia de la captura de la energía de excitación por los centros de reacción abiertos del PSII (F_v/F_m ; Anexo 8.1) disminuyó a medida que aumentaron los niveles de luz, siendo

más evidente en el T₀ que en T₁. En condiciones de secano (S), *A. donax* no mostró diferencias significativas en comparación con el regadío (R) ni entre los dos tiempos de medición.

Tabla 4.2. Medida de F_v/F_m de *A. donax* crecidas en condiciones de riego y secano y tomadas en diferentes momentos (T₀: primavera y T₁: principio de verano). Los valores representan la media \pm SE de tres réplicas (n=3). R (tratamiento de regadío), S (tratamiento de secano). Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias (P<0.05) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.

Parámetro	Tiempo	Tratamiento	Resultado
F_v/F_m	T ₀	R	0.73 \pm 0.01 Aa
	T ₀	S	0.73 \pm 0.01 Aa
	T ₁	R	0.81 \pm 0.00 Aa
	T ₁	S	0.79 \pm 0.01 Aa

4.1.2.3. Contenido de clorofilas

El contenido de clorofilas fue medido a lo largo del experimento (T₀ y T₁), mostrándose los resultados en la Tabla 4.3.

En T₀, las hojas de *A. donax* presentaron valores iguales en ambos tratamientos. Sin embargo, se obtuvieron diferencias significativas cuando se compararon los tiempos, disminuyendo un 5 % (R) y un 8 % (S) en T₁ respecto a T₀.

Tabla 4.3. Contenido de clorofilas (SPAD) en plantas *A. donax* crecidas en condiciones de regadío y secano. Parámetro medido en diferentes momentos (T₀: primavera y T₁: principio de verano). Los valores representan la media \pm SE de cuatro réplicas (n=4). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas (P<0.05) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias (P<0.05) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.

Tiempo	Tratamiento	Media \pm SE
T ₀	R	42.33 \pm 0.87 Aa
	S	42.33 \pm 0.87 Aa
T ₁	R	40.11 \pm 1.36 Bb
	S	38.90 \pm 1.24 Cc

4.1.2.4. Eficiencia en el uso del agua

Los resultados de la $EUA_{intrínseca}$ (Tabla 4.4) para el tratamiento R no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, en el tratamiento S, si se compara entre los tiempos T_0 y T_1 se observa un incremento en la EUA de un 73 %, presentando diferencias significativas.

Tabla 4.4. Eficiencia en el uso del agua ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$) en plantas de *A. donax* crecidas en condiciones de regadío y secano. Parámetro medido en diferentes momentos (T_0 : primavera y T_1 : principio de verano). Los valores representan la media \pm SE de cuatro réplicas ($n=4$). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ($P<0.05$) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.

Tiempo	Tratamiento	Media \pm SE
T_0	R	78.13 \pm 5.78 Aa
	S	78.13 \pm 5.78 Aa
T_1	R	66.68 \pm 9.56 Aa
	S	134.81 \pm 10.52 Bb

4.1.2.5. Contenido hídrico relativo

A. donax presentó un alto porcentaje de CHR al inicio del experimento (T_0), el cual fue mantenido a lo largo del experimento (Tabla 4.5) en las plantas bajo condiciones de regadío y secano, sin encontrarse diferencias significativas entre los tiempos y tratamientos evaluados. Sin embargo, en el caso del T_1 para el tratamiento S se incrementó el CHR en un 5 % respecto al T_0 .

Tabla 4.5. Contenido hídrico relativo (%) en plantas de *A. donax* crecidas en condiciones de regadío y secano. Parámetro medido en diferentes momentos (T_0 : primavera y T_1 : principio de verano). Los valores representan la media \pm SE de cuatro réplicas ($n=4$). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ($P<0.05$) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.

Tiempo	Tratamiento	Media \pm SE
T_0	R	87.30 \pm 0.35 Aa
	S	86.25 \pm 2.72 Aa
T_1	R	89.43 \pm 2.57 Aa
	S	90.68 \pm 1.26 Aa

4.1.3. Análisis moleculares

Para el análisis molecular, se trabajó con un total de 50 muestras de *A. donax* del ecotipo Piccoplant (25 muestras R y 25 muestras S).

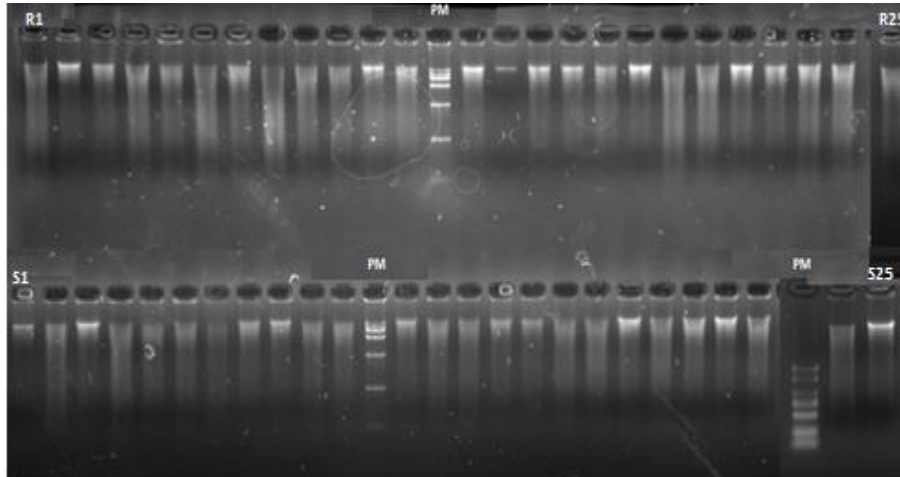


Figura 4.6. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % para verificar la calidad de ADN de *A. donax* (R: Regadío, S: Secano, MP: Marcador de peso molecular).

La Figura 4.6 corresponde al resultado de una electroforesis en gel de agarosa al 1 % para comprobar la calidad del ADN extraído, realizada después de la extracción de ANDg (Apartado 3.3.5.1), donde se puede observar el marcador de peso molecular (PM), además de las muestras de R y S en la primera y segunda fila, respectivamente. La visualización de bandas en el gel de agarosa indica que la calidad de ADN extraído fue óptima.

Basando nuestro experimento en el *Universal Network Enabled Analysis Kit* (UNEAK), se consiguieron tres archivos con resultados, que incluyeron el HapMap.hmp.txt, HapMap.hmc.txt y HapMap.fas.txt. Se registró la información de los SNPs, el número de etiquetas en cada uno de los clones y la secuencia de las etiquetas de los SNPs, respectivamente. A continuación, con la información obtenida en esos archivos, se consiguieron los siguientes resultados (Tabla 4.6):

Tabla 4.6. GBS *raw data* de las muestras R y S del Experimento I.

Número total de lecturas	Número de lecturas aceptadas	Porcentaje de lecturas aceptadas	Profundidad media de cada clon	Número de SNP
197,671,204	144,058,366	73 %	0.288 Gb	319,900

Esta tabla muestra el número total de lecturas, muestra el número total de lecturas, lecturas con código de barras y sitios de corte. De esta manera, las lecturas aceptadas y la profundidad de cada clon pudieron ser calculadas.

Por último, 319.900 marcadores SNP se pudieron desarrollar a partir del procedimiento de GBS. Estos SNP obtenidos, muestran el ADN calificado para la construcción de librerías GBS y el raw data para el UNEAK.

La Figura 4.7 A muestra la frecuencia de los alelos de 319,900 marcadores que concuerda con una distribución normal de los resultados obtenidos, mientras que la Figura 4.7 B muestra que cuantas más etiquetas existan, el número de los SNPs se convierte en una tendencia decreciente, siendo indirectamente proporcional. Por lo tanto, la mayoría de los SNPs obtenidos fueron desarrollados a partir de recuentos bajos de etiquetas.

Después del filtrado de las etiquetas (< 5 podría deberse a errores de secuenciación y > 100 podría deberse a secuenciación repetitiva), 52,842 marcadores SNP alta calidad fueron reservados.

Para investigar las relaciones genéticas entre los tratamientos, se realizó un análisis utilizando los datos de los marcadores generados por GBS y se desarrolló un árbol filogenético.

Los 319,900 marcadores SNP tienen una alta densidad a través de todo el genoma, por ello sirvieron para la construcción del cladograma. Este árbol de agrupamiento se elaboró para revelar su relación filogeográfica mediante el programa MEGA 4.0.2.

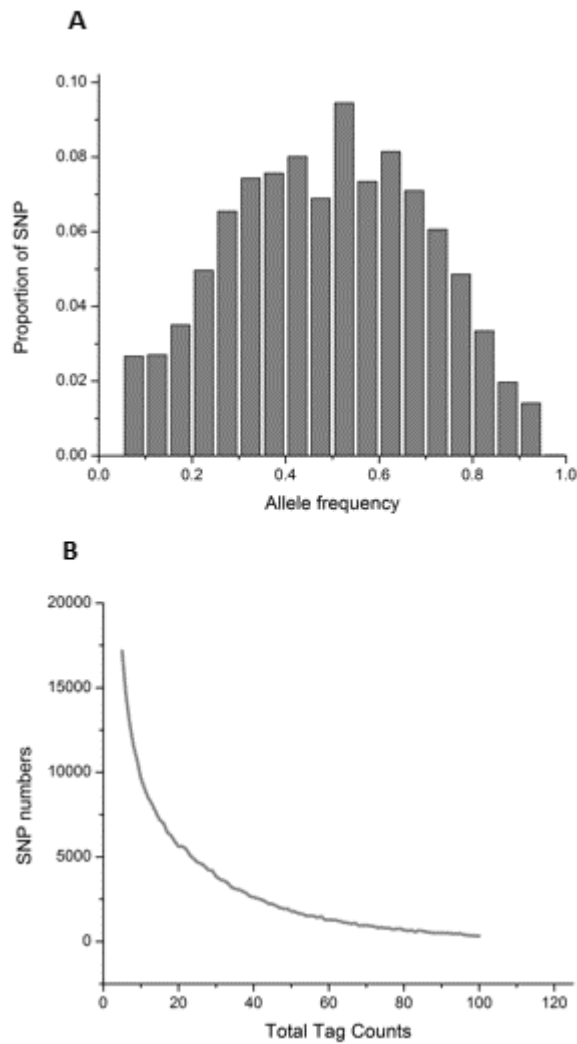


Figura 4.7. (A) Distribución de la frecuencia de los alelos de 319,900 marcadores SNP. **(B)** Distribución de las etiquetas en 50 clones del Experimento I.

Los valores *bootstrap* variaron de 100 % a 45 %, pero eran en su mayoría valores relativamente altos superiores al 50 %, lo que nos indicaría altos niveles de soporte. Los resultados obtenidos podrían proporcionar información importante sobre la relación entre cada clon para el análisis de subestructuras población.

En la Figura 4.8 se pueden observar las 50 muestras evaluadas (25 muestras de R y 25 muestras de S). El árbol muestra las relaciones entre las muestras analizadas a una escala de 0.05 (la escala es válida en sentido vertical y horizontal). Indicando que cuanto más larga sea la línea trazada, existirán

más diferencias, por el contrario si la línea es más corta, la diferencia lo será también. Por ejemplo la muestra S11 y la muestra R20 son las que presentan mayor diferencias genéticas al presentarse en cada extremo del árbol. En cambio, las muestras S4 y S6 pertenecen al mismo grupo con pequeñas diferencias.

Se pudieron identificar algunos pequeños grupos que contenían un tratamiento en específico, por ejemplo: a) R8, R3 y R24; b) S7 y S9; c) S4, S6, S18 y S10; d) R2, R7, R1 y R23; e) S13, S16 y S22, las otras muestras estuvieron repartidas en todo el árbol sin un orden en particular.

A pesar de que R y S recibieron tratamientos distintos no se observaron diferencias marcadas entre ambos tratamientos en el árbol filogenético.

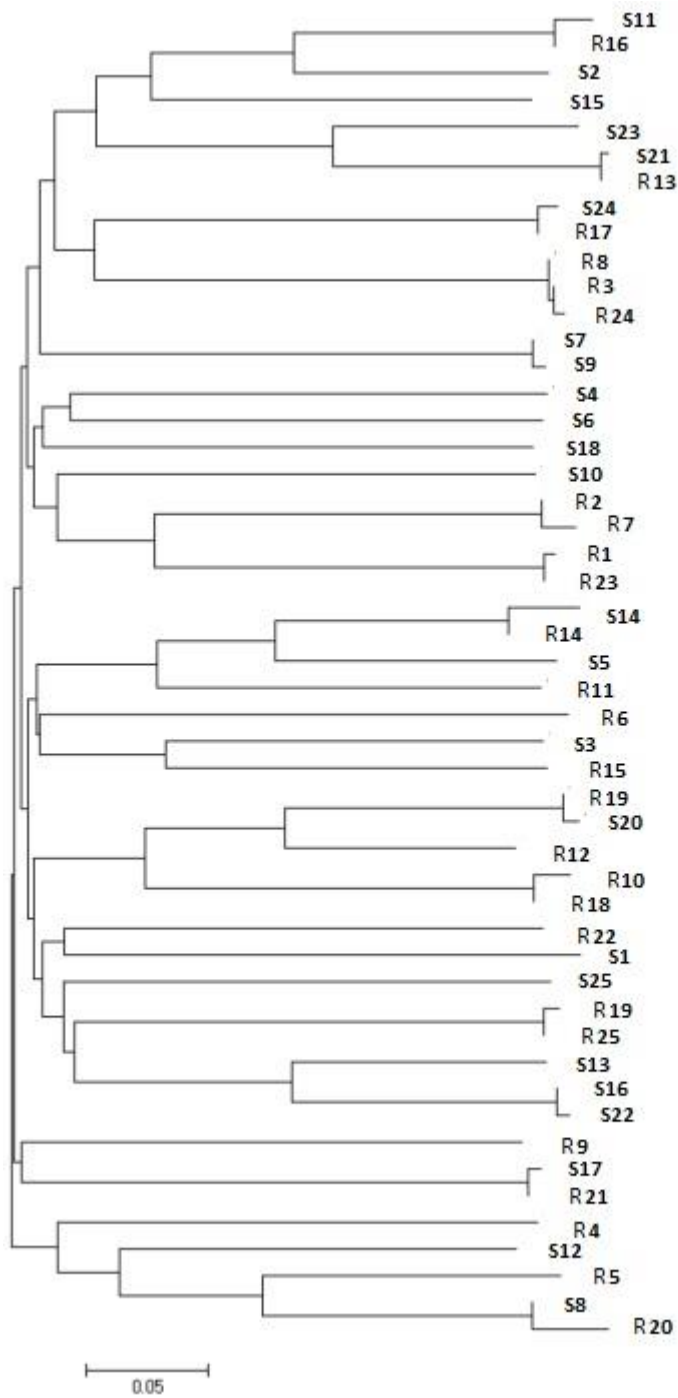


Figura 4.8. Árbol construido a partir de 50 muestras (25 R y 25 S) con 319,900 marcadores SNP.

4.2. Experimento II: Estudio del efecto del estrés hídrico en plantas de *Arundo donax* L. en condiciones de invernadero

4.2.1. Medidas de crecimiento y parámetros de biomasa

La altura de las plantas de *A. donax* del ecotipo Piccoplant, incrementó en todos los tratamientos a lo largo del experimento (C: 47 %; SM: 13 %; SS: 12 %), encontrándose diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los tiempos únicamente en el tratamiento C (Figura 4.9).

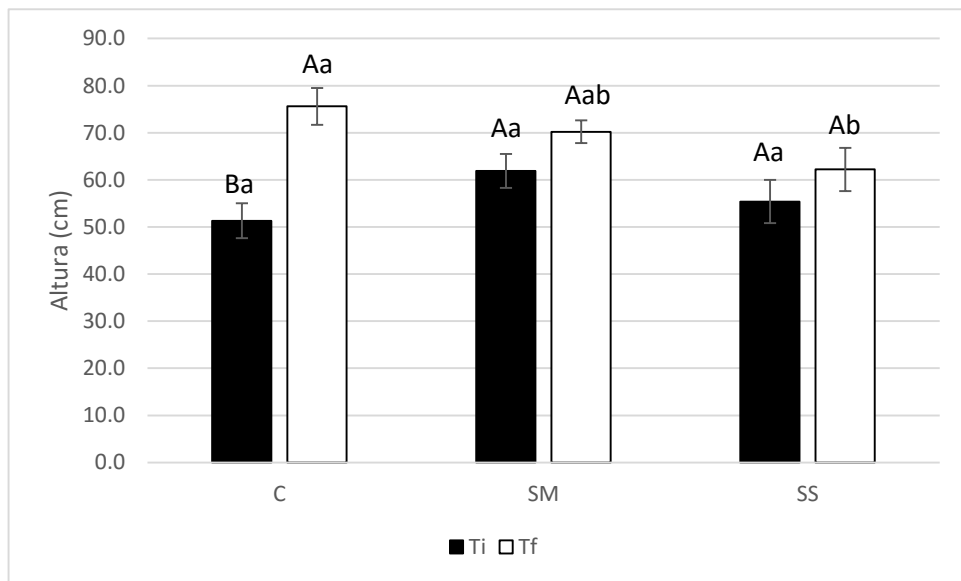


Figura 4.9. Variación en la altura durante los tiempos inicial (Ti) y final (Tf) de *A. donax* Control (C, 100 % CM), sequía moderada (SM, 50 % CM) y sequía severa (SS, 25 % CM). Los valores representan la media \pm SE de nueve réplicas ($n=9$). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.

Los resultados de peso fresco y peso seco de cada órgano, se muestran en la Tabla 4.7. No se visualizaron grandes diferencias entre los tiempos. Sin embargo, se pueden observar diferencias marcadas entre los tratamientos estudiados, donde el tratamiento C, tuvo una mayor cantidad de biomasa seca respecto a SM y SS.

Tabla 4.7. Peso fresco y seco (g) de *A. donax* medidos en los diferentes tiempos (T0, T1 y T2), tratamientos: Control (C, 100 % CM), sequía moderada (SM, 50 % CM) y sequía severa (SS, 25 % CM) y órganos estudiados (hoja, tallo, raíz y rizoma).

Tiempo	Órgano	Tratamiento	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
T0	Hoja	CC	38.3 ± 7.8	7.4 ± 1.9
		SM	22.1 ± 2.5	4.3 ± 0.4
		SS	9.4 ± 1.4	1.8 ± 0.3
	Tallo	CC	42.6 ± 9.8	8.3 ± 3.1
		SM	22.1 ± 2.6	4.6 ± 0.4
		SS	7.3 ± 1.7	2.2 ± 1.0
	Raíz	CC	28.4 ± 5.7	3.7 ± 1.0
		SM	17.4 ± 2.5	2.7 ± 0.1
		SS	10.4 ± 2.1	2.0 ± 0.5
Rizoma	CC	15.8 ± 5.2	3.5 ± 1.2	
	SM	10.1 ± 2.1	2.5 ± 0.3	
	SS	9.0 ± 4.1	2.7 ± 1.4	
T1	Hoja	CC	30.3 ± 3.9	5.0 ± 0.4
		SM	20.6 ± 0.9	4.1 ± 0.2
		SS	9.9 ± 0.5	1.9 ± 0.1
	Tallo	CC	31.0 ± 6.4	5.3 ± 0.6
		SM	19.5 ± 2.6	4.1 ± 0.4
		SS	9.0 ± 0.9	2.3 ± 0.2
	Raíz	CC	19.5 ± 3.4	2.3 ± 0.2
		SM	16.7 ± 2.4	2.3 ± 0.3
		SS	10.5 ± 2.5	1.8 ± 0.2
Rizoma	CC	11.7 ± 2.7	2.0 ± 0.5	
	SM	10.3 ± 2.2	2.8 ± 0.6	
	SS	9.4 ± 2.1	2.7 ± 0.8	
T2	Hoja	CC	37.2 ± 4.7	6.6 ± 0.7
		SM	23.4 ± 0.3	4.6 ± 0.2
		SS	14.9 ± 0.3	3.2 ± 0.2
	Tallo	CC	36.0 ± 7.5	6.9 ± 1.2
		SM	26.5 ± 5.2	5.4 ± 0.4
		SS	15.3 ± 1.7	3.4 ± 0.3
	Raíz	CC	19.6 ± 5.3	2.8 ± 0.4
		SM	26.1 ± 4.6	3.6 ± 0.4
		SS	11.3 ± 1.5	2.4 ± 0.3
Rizoma	CC	22.6 ± 6.0	4.3 ± 1.2	
	SM	21.1 ± 2.3	5.2 ± 0.5	
	SS	9.7 ± 0.8	2.8 ± 0.3	

También se calculó la cantidad de agua en una muestra fresca, respecto a una muestra seca, dando como resultado un factor aproximado de 5.5 veces el peso seco.

Los resultados de área foliar (AF), *shoot/root* (S/R), peso seco total (PST), área de masa foliar (AMF) y área foliar específica (AFE) medidos al final del experimento (Tf), se muestran en la Tabla 4.8.

Respecto al AF, se observó una disminución de este parámetro cuando se limitó el agua, disminuyendo un 40 % si se compara C con SM y un 67 % si se compara C con SS, observándose diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

Una disminución conforme si limitaba el agua también se observó en el S/R, con un 27 % menos si se compara entre C y SM y 45 % menos entre C y SS, presentándose diferencias significativas.

Siguiendo la misma tendencia que en los casos anteriores, el PST se vio afectado en los tratamientos con estrés hídrico, disminuyendo un 26 % de C a SM (aunque sin diferencias significativas) y un 57 % de C a SS (con diferencias significativas).

Tabla 4.8. Efecto del estrés en parámetros de biomasa: área foliar (AF), *shoot/root* (S/R), peso seco total (PST), índice de área de masa foliar (AMF) y Área foliar específica (AFE) en *A. donax*. Los tratamientos evaluados fueron: Control (C, 100 % CM), sequía moderada (SM, 50 % CM) y sequía severa (SS, 25 % CM) al final del experimento (Tf). Los valores representan la media \pm SE de nueve réplicas (n=9). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas (P<0.05) entre tratamientos.

Tratamiento	AF (m ²)	S/R	PST (g)	AMF (gr/m ²)	AFE (m ² /kg)
C	0.15 \pm 0.01 A	4.52 \pm 0.17 A	16.12 \pm 2.11 A	41.21 \pm 2.38 A	24.82 \pm 1.23 A
SM	0.09 \pm 0.00 B	3.29 \pm 0.22 B	11.86 \pm 0.55 A	47.81 \pm 1.31 A	21.04 \pm 0.58 B
SS	0.05 \pm 0.00 C	2.50 \pm 0.26 C	7.00 \pm 0.71 B	47.96 \pm 2.08 A	21.15 \pm 0.87 B

El AMF fue el único parámetro que incrementó conforme se limitaba el agua, aumentando los niveles alrededor del 16 %, comparando C-SM y C-SS, aunque no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Finalmente, el AFE tuvo un comportamiento similar al AMF pero a la inversa, este parámetro disminuyó 15 % entre C-SM y el mismo valor entre C-SS, aunque sí se encontraron diferencias significativas con el control.

4.2.2. Caracterizaciones fisiológicas

4.2.2.1. Intercambio de gases

Se observaron diferencias significativas en los parámetros fotosintéticos (A_{sat} , A_{max} , g_s , $V_{c,max}$ y J_{max}) medidos al final del experimento (T_f), entre el tratamiento C y el tratamiento SS (Tabla 4.9).

En todos los casos, los valores de los parámetros se vieron afectados negativamente conforme se limitaba el agua.

Respecto al A_{sat} , se observó una disminución del 43 % entre C y SM y una disminución de 71 % entre C y SS, ambos casos presentaron diferencias significativas respecto al control.

En A_{max} , se observó una disminución del 51 % entre C y SM y, una disminución de 65 % entre C y SS, ambos casos presentaron diferencias significativas respecto al control. Sin embargo, cuando se compara entre SM y SS no se observan diferencias significativas entre esos tratamientos.

De acuerdo a los resultados de g_s , se pudo observar una disminución del 70 % entre los tratamientos C y SM, mientras que si se compara C con SS la disminución fue mayor (84 %), en ambos casos se presentaron diferencias significativas respecto al control.

En el caso de $V_{c,max}$, presentó una disminución del 27 % y 28 % entre C-SM y C-SS respectivamente. En este caso también se presentaron diferencias significativas respecto al control.

Finalmente, los resultados de J_{max} siguieron la misma tendencia de los otros parámetros, mostrando disminuciones del 56 % entre los tratamientos C y SM y 70 % entre C y SS, en los dos casos se presentaron diferencias significativas respecto al control. Sin embargo, si se compara entre SM y SS no se observan diferencias significativas entre esos tratamientos.

Los resultados de las mediciones realizadas en el Ti se muestran en el Anexo 8.2.

Tabla 4.9. Parámetros fotosintéticos medidos en plantas *A. donax* en tres tratamientos: Control (C, 100 % CM), sequía moderada (SM, 50 % CM) y sequía severa (SS, 25 % CM). Tasa de asimilación neta de CO₂ a saturación de luz (A_{sat}), tasa de fotosíntesis neta máxima (A_{max}), conductancia estomática (g_s), velocidad de carboxilación de la RuBisCO ($V_{c,max}$) y tasa de transporte de electrones (J_{max}) al final del experimento (Tf). Los valores representan la media \pm SE de tres repeticiones (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05) entre tratamientos.

Parámetro	Tratamiento	Media \pm SE
A_{sat} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	C	30.05 \pm 0.32 A
	SM	17.05 \pm 0.14 B
	SS	8.66 \pm 1.67 C
A_{max} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	C	45.25 \pm 1.30 A
	SM	22.25 \pm 1.01 B
	SS	16.00 \pm 2.75 B
g_s ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	C	0.495 \pm 0.009 A
	SM	0.149 \pm 0.007 B
	SS	0.080 \pm 0.022 C
$V_{c,max}$ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	C	130.13 \pm 2.36 A
	SM	94.54 \pm 1.56 B
	SS	42.17 \pm 5.17 C
J_{max} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	C	293.05 \pm 13.15 A
	SM	127.48 \pm 0.55 B
	SS	89.09 \pm 18.06 B

4.2.2.2. Fluorescencia modulada de clorofilas

En los resultados obtenidos de fluorescencia modulada de clorofilas al final del experimento (Tf), el parámetro F_v/F_m no mostró diferencias significativas en ninguno de los tratamientos evaluados, manteniéndose un valor promedio de 0.8 en C, SM y SS. En cambio, sí se presentaron disminuciones del 16 % entre los tratamientos C y SM y del 20 % entre los tratamientos C y SS. Además, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos sometidos a estrés hídrico y el control (Tabla 4.10).

Los resultados de las mediciones de Ti se muestran en el Anexo 8.2.

Tabla 4.10. Medida de los parámetros de fluorescencia (F_v/F_m y F_v/F_m') en *A. donax* en tres tratamientos: Control (C, 100 % CM), sequía moderada (SM, 50 % CM) y sequía severa (SS, 25 % CM) al final del experimento (Tf). Los valores representan la media \pm SE de tres repeticiones (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos.

Parámetro	Tratamiento	Media \pm SE
F_v/F_m	C	0.817 \pm 0.001 A
	SM	0.814 \pm 0.005 A
	SS	0.820 \pm 0.003 A
F_v/F_m'	C	0.566 \pm 0.004 A
	SM	0.473 \pm 0.001 B
	SS	0.450 \pm 0.019 B

4.2.2.3. Contenido de clorofilas

El contenido de clorofilas en las hojas de *A. donax* fue de 42 unidades SPAD aproximadamente en todos los tratamientos (C, SM y SS), tanto en Ti como en Tf. Los resultados entre tiempos y tratamientos no mostraron diferencias significativas (Anexo 8.3).

4.2.2.4. Eficiencia en el uso del agua

En general, se observó que durante el Tf, las hojas de *A. donax* presentaron una mayor $EUA_{intrínseca}$ (Tabla 4.11), incrementando en SM un 89 % y en SS un 78 % respecto al control, encontrándose diferencias significativas en estos dos últimos tratamientos en comparación con C.

Los resultados de las mediciones de T_i se muestran en el Anexo 8.2.

Tabla 4.11. Eficiencia en el uso del agua ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$) en plantas de *A. donax* crecidas en tres tratamientos. Control (C, 100 % CM), sequía moderada (SM, 50 % CM) y sequía severa (SS, 25 % CM). Parámetro medido al final del experimento (T_f). Los valores representan la media \pm SE de cuatro réplicas ($n=4$). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P<0.05$) tratamientos.

Tratamiento	Tiempo	Media \pm SE
C	T_f	60.71 \pm 2.49 A
SM	T_f	114.43 \pm 9.52 B
SS	T_f	108.25 \pm 7.67 B

4.2.2.5. Contenido hídrico relativo

El CHR, fue medido al final del experimento (T_f), mostrándose los resultados en la Tabla 4.12. En general, se observó que las hojas de *A. donax* presentaron un descenso de 3 % y 15 % para SM y SS, respectivamente respecto a C. Además, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos C y SM, pero sí entre el tratamiento C y el tratamiento SS.

Tabla 4.12. Contenido hídrico relativo (%) en plantas de *A. donax* crecidas en tres tratamientos. Control (C, 100 % CM), sequía moderada (SM, 50 % CM) y sequía severa (SS, 25 % CM). Parámetro medido al final del experimento (T_f). Los valores representan la media \pm SE de cuatro réplicas ($n=4$). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P<0.05$) tratamientos.

Tratamiento	Tiempo	Media \pm SE
C	T_f	93.4 \pm 0.9 A
SM	T_f	90.6 \pm 1.0 A
SS	T_f	76.8 \pm 4.1 B

4.2.3. Análisis isotópico

4.2.3.1. Composición isotópica de ^{13}C del CO_2 respirado en oscuridad (R)

Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de CO_2 respirado en la oscuridad ($\delta^{13}\text{C}_R$), fueron de -20 ‰ aproximadamente, (Tabla 4.13), para hoja, tallo, raíz y rizoma

respectivamente en el T0 y tratamiento C. A su vez, se pudo observar un ligero enriquecimiento de ^{13}C cuando se limitaba el agua. Sin embargo, solamente se encontraron diferencias significativas en el tallo y la raíz ($P=0.041$ y 0.029 , respectivamente) entre los tratamientos C y SS. En el T0, el órgano más enriquecido fue el tallo en cada uno de los tratamientos evaluados (C, SM y SS).

Después del marcaje (T1), se observó un enriquecimiento de ^{13}C en todos los órganos. De la misma manera que en el caso anterior, se pudo observar un enriquecimiento de ^{13}C cuando se limitaba el agua, con excepción de las hojas aunque sin diferencias significativas entre los tratamientos ($P=0.229$), este enriquecimiento fue ligero en el caso del tallo y la raíz y más marcado en el caso del rizoma. En el T1, el órgano más enriquecido fue el rizoma para cada uno de los tres tratamientos evaluados.

Para el T2, el empobrecimiento de ^{13}C fue visible en todos los órganos en comparación con el T1 para todos los tratamientos. El tratamiento C se mostró empobrecido en comparación con el tratamiento SM y más empobrecido aún en comparación con el tratamiento SS. En el T2, el órgano más enriquecido fue la hoja en el tratamiento C, mientras que el rizoma fue el órgano más enriquecido en los tratamientos con estrés hídrico.

En general, el rizoma fue el órgano con más alta $\delta^{13}\text{C}_R$, excepto en el control. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con los otros órganos evaluados ($P=0.129$).

4.2.3.2. Composición isotópica de ^{13}C en la materia orgánica total (MOT)

Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de la materia orgánica total ($\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$) fueron de -29 ‰ aproximadamente, para hoja, tallo, raíz y rizoma respectivamente en el T0 y tratamiento C (Tabla 4.13). Conforme se limitaba el agua, se pudo observar un ligero enriquecimiento de ^{13}C en todos los órganos evaluados, obteniéndose diferencias significativas entre el tratamiento C y SS, excepto en las hojas ($P=0.184$). En el T0, los órganos más enriquecidos fueron la raíz y el rizoma.

Se observó un enriquecimiento de ^{13}C después del marcaje (T1) en todos los órganos, siendo el tallo el órgano más enriquecido en el tratamiento C y SM, mientras que en el tratamiento SS lo fue el rizoma. De la misma manera que en el caso anterior, se pudo observar un enriquecimiento de ^{13}C al limitarse el agua, excepto en los tallos y raíces que incrementaron sus niveles de ^{13}C en el tratamiento SM, mientras que en el tratamiento SS los niveles de ^{13}C decayeron ($P=0.034$ y 0.004 , respectivamente).

Al T2, el empobrecimiento de ^{13}C fue visible en general, el tratamiento C estuvo mucho más empobrecido que en condiciones de estrés (SM y SS) en cada órgano. Para este tiempo, en condiciones control, el rizoma fue el órgano más enriquecido, mientras que en los tratamientos SM y SS el órgano más enriquecido fue el tallo.

Se encontraron diferencias significativas en la mayoría de los órganos entre los tiempos T1 y T2, excepto en las hojas y rizomas del tratamiento SM ($P=0.689$ y 0.129 , respectivamente).

En general, el tallo fue el órgano con más alta $\delta^{13}\text{C}_R$.

4.2.3.3. Composición isotópica de ^{13}C en los azúcares solubles totales (AST)

Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de los azúcares solubles totales ($\delta^{13}\text{C}_{\text{AST}}$), fueron de -29‰ aproximadamente, para hoja, tallo, raíz y rizoma respectivamente en el T0 y tratamiento C (Tabla 4.13). Un enriquecimiento de ^{13}C fue observado en cada órgano conforme se sometía a las plantas bajo condiciones de estrés hídrico y fueron encontradas diferencias significativas entre los tratamientos C-SS en cada órgano excepto en los tallos ($P=0.087$). El órgano más enriquecido en el T0 fue el rizoma.

Después del marcaje (T1), un gran enriquecimiento de ^{13}C fue observado para todos los órganos en el tratamiento C, este enriquecimiento de ^{13}C además, se observó en cada órgano mientras se limitaba el agua. Sin embargo,

diferencias significativas solo se encontraron en los tallos y las raíces ($P=0.020$ y 0.005 , respectivamente). El tallo fue órgano más enriquecido en el T1 para los tres tratamientos evaluados.

Para el T2, el empobrecimiento de ^{13}C fue perceptible en todos los órganos en comparación con el T1. De la misma manera que en los casos anteriores, se observó que los tratamientos con condiciones de sequía se encontraron más enriquecidos en ^{13}C que el tratamiento C.

En general, el tallo fue el órgano con mayor $\delta^{13}\text{C}_{\text{AST}}$, en T1 (diferencias significativas en los tratamientos MS y SS) y los rizomas en T2.

4.2.3.4. Composición isotópica de ^{13}C en el almidón (ALM)

Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ del almidón ($\delta^{13}\text{C}_{\text{ALM}}$) fueron de -28 ‰ aproximadamente, para hoja, tallo, raíz y rizoma respectivamente en el T0 y tratamiento C (Tabla 4.13). Como en los casos anteriores, un enriquecimiento de ^{13}C fue observado en cada órgano conforme se limitaba el agua y se encontraron diferencias significativas todos los órganos excepto en las hojas ($P=0.078$) entre los tratamientos C y SS. El órgano más enriquecido en ^{13}C en el T0 fue el rizoma.

Después del marcaje (T1), un enriquecimiento de ^{13}C fue observado para todos los órganos del tratamiento C. No hubo diferencias significativas entre tratamientos, excepto en el tallo ($P=0.015$) respecto a los otros órganos. El órgano más enriquecido en este tiempo fue el tallo.

Para el T2, el empobrecimiento de ^{13}C fue visible en todos los órganos, de la misma manera que en los casos anteriores, se pudo observar que el tratamiento C se encontraba empobrecido en ^{13}C en relación a los tratamientos SM y SS durante los tres los tiempos evaluados.

En general, los tallos fueron los órganos con más alta $\delta^{13}\text{C}_{\text{ALM}}$, en cada tratamiento, presentando diferencias significativas en comparación con otros órganos ($P=0.017$).

Tabla 4.13. Composición isotópica de ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$, ‰) del CO_2 respirado en la oscuridad ($\delta^{13}\text{C}_R$, ‰), azúcares solubles totales ($\delta^{13}\text{C}_{\text{AST}}$, ‰), almidón ($\delta^{13}\text{C}_{\text{ALM}}$, ‰) y materia orgánica total ($\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$, ‰), en hojas, tallos, raíz y rizoma en *A. donax* en los tratamientos: Control (C, 100 % CM), sequía moderada (SM, 50 % CM) y sequía severa (SS, 25 % CM) antes del marcaje (T0), un día después del marcaje (T1) y siete días después del marcaje (T2). Los valores representan la media \pm SE de tres réplicas (n=3). Los resultados estadísticos se muestran en el Anexo 8.4.

Tiempo	Órgano	Tratamiento	Respiración	Azúcares	Almidón	MOT
T0	Hoja	C	-21.5 \pm 0.7	-30.5 \pm 0.5	-29.9 \pm 0.6	-29.4 \pm 0.9
		SM	-20.0 \pm 0.6	-28.6 \pm 0.6	-28.4 \pm 0.3	-28.0 \pm 0.3
		SS	-19.5 \pm 0.8	-27.7 \pm 0.6	-29.1 \pm 0.1	-27.7 \pm 0.5
	Tallo	C	-19.0 \pm 0.5	-29.7 \pm 0.1	-29.3 \pm 0.2	-30.6 \pm 0.1
		SM	-18.2 \pm 0.6	-26.7 \pm 0.7	-27.4 \pm 0.6	-29.6 \pm 0.4
		SS	-16.6 \pm 0.6	-26.8 \pm 1.3	-25.6 \pm 0.7	-28.0 \pm 0.3
	Raíz	C	-20.7 \pm 0.7	-28.3 \pm 0.4	-28.4 \pm 0.1	-29.1 \pm 0.2
		SM	-17.9 \pm 0.7	-25.6 \pm 0.4	-26.1 \pm 0.3	-26.3 \pm 0.8
		SS	-17.0 \pm 0.7	-24.4 \pm 0.3	-24.7 \pm 0.0	-25.4 \pm 0.3
	Rizoma	C	-22.5 \pm 0.8	-27.7 \pm 0.3	-27.0 \pm 0.2	-28.8 \pm 0.1
		SM	-21.1 \pm 0.7	-24.9 \pm 0.2	-24.9 \pm 0.1	-27.4 \pm 0.0
		SS	-19.8 \pm 0.8	-24.5 \pm 0.4	-23.9 \pm 0.7	-26.0 \pm 0.5
T1	Hoja	C	36.2 \pm 9.2	34.3 \pm 17.8	25.3 \pm 1.2	5.7 \pm 2.1
		SM	24.5 \pm 6.8	43.6 \pm 2.5	8.2 \pm 0.7	4.2 \pm 1.5
		SS	15.9 \pm 5.7	81.1 \pm 7.4	16.9 \pm 12.9	13.1 \pm 4.2
	Tallo	C	13.2 \pm 3.1	90.6 \pm 18.4	65.6 \pm 13.3	27.2 \pm 4.5
		SM	33.0 \pm 2.8	117.1 \pm 7.2	113.9 \pm 2.4	53.8 \pm 7.9
		SS	41.7 \pm 11.3	173.7 \pm 16.6	138.5 \pm 19.4	33.1 \pm 3.5
	Raíz	C	34.6 \pm 5.4	33.8 \pm 14.9	19.5 \pm 3.8	0.6 \pm 0.6
		SM	32.6 \pm 8.2	81.6 \pm 6.5	20.1 \pm 1.2	20.0 \pm 3.3
		SS	43.1 \pm 10.6	105.5 \pm 4.1	22.0 \pm 2.3	6.0 \pm 1.2
	Rizoma	C	59.3 \pm 15.7	77.9 \pm 19.8	40.7 \pm 16.9	14.8 \pm 2.7
		SM	97.2 \pm 11.2	98.8 \pm 13.0	41.7 \pm 11.1	18.5 \pm 2.3
		SS	108.1 \pm 6.6	105.1 \pm 11.8	42.2 \pm 4.3	37.7 \pm 2.5
T2	Hoja	C	-7.0 \pm 1.1	-5.1 \pm 4.3	-7.8 \pm 6.1	-11.7 \pm 4.3
		SM	-6.3 \pm 1.0	18.6 \pm 3.9	12.7 \pm 7.8	0.3 \pm 0.4
		SS	-4.1 \pm 0.7	20.4 \pm 2.2	13.3 \pm 7.4	3.1 \pm 0.8
	Tallo	C	-9.8 \pm 0.6	-12.9 \pm 0.4	-4.4 \pm 4.4	-9.4 \pm 2.5
		SM	-4.3 \pm 2.0	27.2 \pm 8.1	40.0 \pm 8.6	28.8 \pm 5.1
		SS	-0.8 \pm 2.4	27.6 \pm 6.1	58.8 \pm 14.3	9.9 \pm 5.0
	Raíz	C	-11.5 \pm 1.8	-13.3 \pm 1.6	-13.8 \pm 0.1	-15.3 \pm 1.0
		SM	-1.3 \pm 1.8	27.3 \pm 7.8	4.9 \pm 0.3	-5.8 \pm 2.2
		SS	-2.0 \pm 0.2	26.6 \pm 4.5	7.4 \pm 11.1	3.0 \pm 3.2
	Rizoma	C	-13.6 \pm 2.6	-1.5 \pm 7.0	-0.7 \pm 4.6	-5.5 \pm 4.1
		SM	9.5 \pm 2.8	39.1 \pm 3.5	5.9 \pm 2.4	16.6 \pm 3.8
		SS	6.6 \pm 1.8	53.9 \pm 0.8	24.3 \pm 10.6	4.9 \pm 1.8

4.3. Experimento III: Estudio molecular de cinco ecotipos de *Arundo donax* L.

4.3.1. Medidas de crecimiento

Los parámetros de crecimiento evaluados en este experimento, se muestran en la Tabla 4.14. Todos los ecotipos estaban en buenas condiciones y el comportamiento entre ecotipos fue similar, por ello solo se tomaron medidas de peso fresco y peso seco. Si bien el número de muestras fue variado, el peso promedio de cada tubo se encontró dentro del rango de lo solicitado para la extracción de ADNg. Los resultados de la tabla muestran el PF y PS acumulado y promedio de los cinco ecotipos evaluados. En los pesos acumulados (PF y PS), los pesos más altos fueron los correspondientes al ecotipo Martinensis, mientras que los pesos más bajos correspondían a Granadensis, estos resultados muestran el peso total de lo enviado y reflejan el número de muestras trabajadas: 52 muestras para Martinensis y solo nueve muestras para Granadensis. Es por ello, que un resultado más exacto resultó ser el peso seco promedio, dónde Granadensis fue el ecotipo que obtuvo el mayor PS, mientras que Piccoplant obtuvo el PS más bajo por muestra enviada para la extracción de ADNg.

Tabla 4.14. Peso fresco acumulado (g; suma total de muestras de hojas por duplicado) y peso fresco (PF) promedio (peso fresco promedio de los tubos enviados); Peso seco (PS) acumulado (g) y peso seco promedio (g) de *A. donax*. Los resultados mostrados indican solo las muestras de hojas para la extracción de ADNg. El peso seco refiere al resultado obtenido después que las muestras fueron liofilizadas.

Ecotipo	N° de muestras	PF acumulado (g)	PF promedio (g)	PS acumulado (g)	PS promedio (g)
Piccoplant	27	978.88	16.52 ± 0.49	213.31	3.57 ± 0.12
Fondachello	24	1028.14	19.28 ± 0.54	231.90	4.35 ± 0.13
Martinensis	52	2073.49	19.98 ± 0.44	480.29	4.62 ± 0.11
Argentum	19	802.38	20.13 ± 0.59	180.63	4.53 ± 0.14
Granadensis	9	274.90	18.82 ± 1.14	66.73	4.9 ± 0.18

4.3.2. Contenido de clorofilas

Las hojas de los cinco ecotipos de *A. donax* estudiados, presentaron valores alrededor de 42 unidades SPAD aproximadamente, tanto para el tiempo inicial como para el tiempo final. Los resultados entre tiempos y ecotipos evaluados no mostraron diferencias significativas (Anexo 8.5).

4.3.3. Conteo de cromosomas

Las fotografías obtenidas para el recuento se muestran en la Figura 4.10, mientras que en la Tabla 4.15 se muestra la media y el error estándar para el conteo de cromosomas para cada ecotipo evaluado.

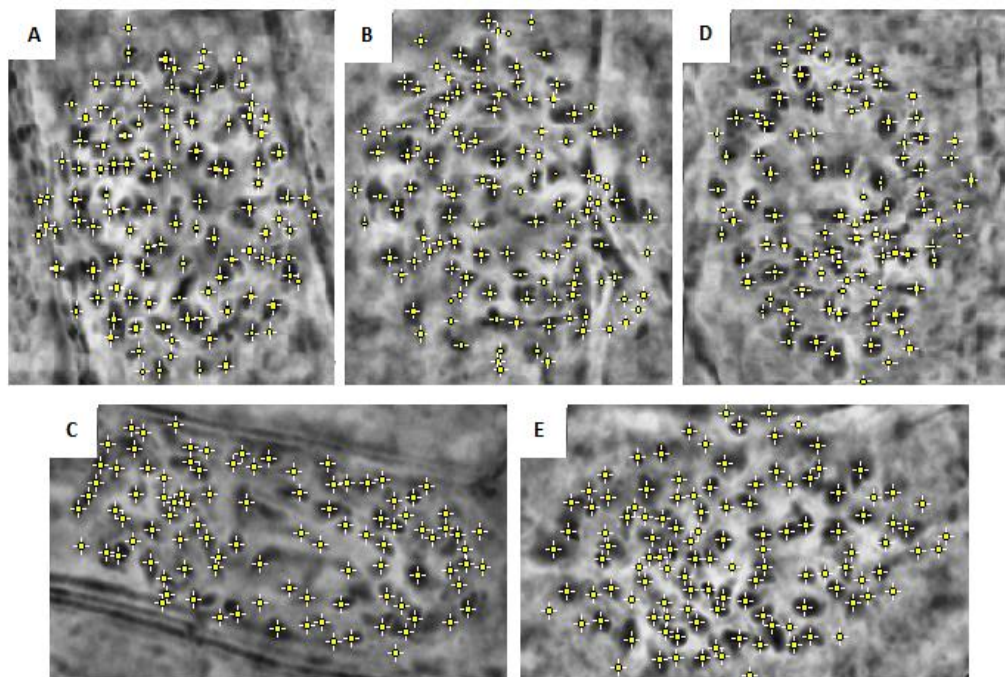


Figura 4.10. Conteo de cromosomas de *A. donax* usando el programa Fiji (Image J, Wisconsin, Estados Unidos), obtenido a partir de raíces de cultivo semihidropónico (se muestran los resultados en metafase). (A) Piccoplant, (B) Fondachello, (C) Martinensis, (D) Argentum, (E) Granadensis. Aumento: 1000X.

Los recuentos cromosómicos somáticos en los cinco ecotipos variaron de 98 cromosomas (Granadensis) a 124 cromosomas (Argentum), obteniéndose diferencias significativas, excepto entre los ecotipos Fondachello y Argentum.

Tabla 4.15. Número de cromosomas de cada ecotipo empleado. Los valores representan la media \pm SE de cincuenta réplicas (n=50). Medias con la misma letra, no son significativamente diferentes ($P < 0.05$) según el Test de Duncan.

Ecotipo	Número de cromosomas
	Media \pm SE
Granadensis	98 \pm 0.88 A
Piccoplant	110 \pm 0.80 B
Martinensis	116 \pm 2.05 C
Fondachello	122 \pm 1.51 D
Argentum	124 \pm 1.82 D

En nuestros los resultados, se muestran recuentos cercanos al número octaploide, nonaploide y decaploide: $2n=8x=96$; $2n=9x=108$ y $2n= 10x=120$ respectivamente.

4.3.4. Análisis molecular

4.3.4.1. Extracción de ADN, pruebas de calidad y PCR

Los resultados de la calidad del ADN_g extraído, se muestran a través de una fotografía del gel de agarosa al 1 %, después de la electroforesis (Tabla 4.12). Mientras que los resultados de la dilución de ADN_g (concentración ideal de: 10 ng en un volumen de 40 μ l) para la construcción de librerías NGS se muestran en el Anexo 8.6.

Para el Experimento III, dado que el número de muestras de *A. donax* fue 131, se dividieron en cuatro grupos en relación al número de códigos de barras (131/33; Apartado 3.3.5.3.3), lo que nos dio un total de cuatro grupos (tres grupos con 33 y un grupo con 32 códigos de barras). Por tanto, se

tuvieron que combinar las muestras de distintos ecotipos (Tabla 4.16), obteniéndose cuatro carriles.

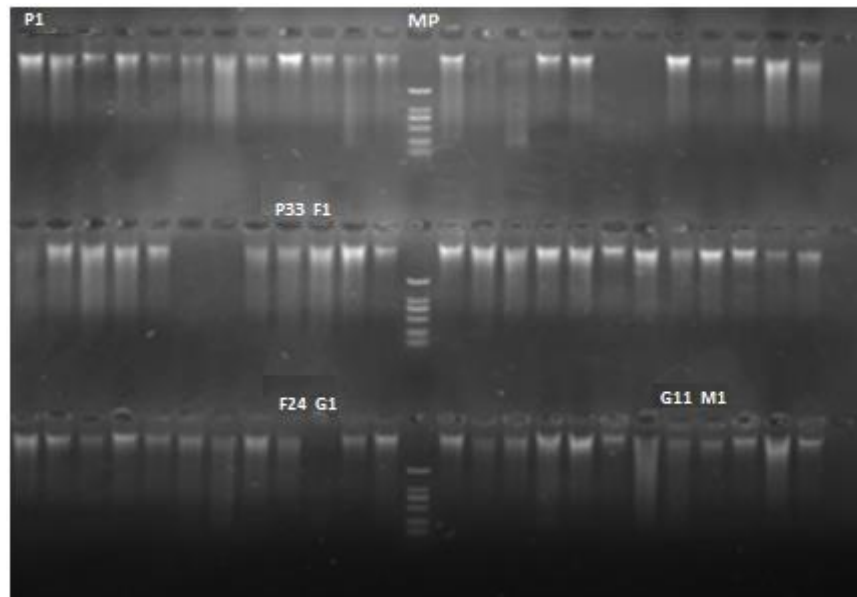


Figura 4.11. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % para verificar la calidad de ADN de *A. donax* (P: Piccoplant, G: Granadensis, M: Martinensis, F: Fondachello, MP: Marcador de peso molecular).

Tabla 4.16. Número de carriles usadas en el trabajo y las combinaciones de las muestras. Piccoplant (P) = 27 muestras; Fondachello (F) = 24 muestras; Granadensis (G) = 9 muestras; Martinensis (M) = 52 muestras y Argentum (A) = 19 muestras.

Muestras	N° de muestras / carril	Tamaño de datos / carril (Gb)	Número de carriles	Total de datos (Gb)
27P + 6F	33	0.57	1	18.75
18F + 9G + 6M	33	0.57	1	18.75
33M	33	0.57	1	18.75
13M + 19A	32	0.59	1	18.75

De esta manera se estableció el orden de los códigos de barra en las placas de Elisa. El orden de las muestras de ADN se muestra en el Anexo 8.7 y los resultados de la concentración de ADN que se midió con el fluorómetro Qubit® 2.0 Fluorometer, que se muestra en el Anexo 8.8.

Con las cuatro muestras obtenidas, se realizó la PCR (Apartado 3.3.5.2.3) y posteriormente la electroforesis para purificar el ADN_g extraído.

Luego de la electroforesis y la purificación de las muestras, los ADN calificados se utilizaron para la construcción de la biblioteca GBS y las todas las lecturas fueron recortadas a 100 pb de manera virtual, compilándose los resultados en la Tabla 4.17 que muestra el número total de lecturas, lecturas con código de barras y sitios de corte. Así, la relación de lecturas aceptadas y la profundidad de cada clon se pudieron calcular. Por último, 864,213 marcadores SNP se desarrollaron a partir del procedimiento de GBS. Estos SNP obtenidos, muestran el ADN calificado para la construcción de librerías GBS y el *raw data* para el UNEAK.

Tabla 4.17. GBS *raw data* de los cinco ecotipos del Experimento III.

Ecotipo	Número total de lecturas	Número de lecturas aceptadas	Porcentaje de lecturas aceptadas	Profundidad media de cada clon	Número de SNP
Piccoplant	429,242,100	283,299,786	66 %	0.288 Gb	213,057
Fondachello	420,508,800	273,330,720	65 %	0.288 Gb	210,491
Martinensis	383,828,600	226,458,874	59 %	0.288 Gb	303,593
Argentum	467,701,500	313,360,005	67 %	0.288 Gb	105,417
Granadensis	141,610,400	90,630,656	64 %	0.288 Gb	31,665
Total					864,213

La Figura 4.12 A muestra la frecuencia de los alelos de 864.213 marcadores que concuerda con una distribución normal de los resultados obtenidos, mientras que la Figura 4.12 B muestra que cuantas más etiquetas existan, el número de los SNPs se convierte en una tendencia decreciente, siendo indirectamente proporcional. Por lo tanto, la mayoría de los SNPs obtenidos fueron desarrollados a partir de recuentos bajos de etiquetas.

Después del filtrado de las etiquetas (< 5 podría deberse a errores de secuenciación y > 100 podría deberse a secuenciación repetitiva), 367,017 marcadores SNP alta calidad fueron reservados.

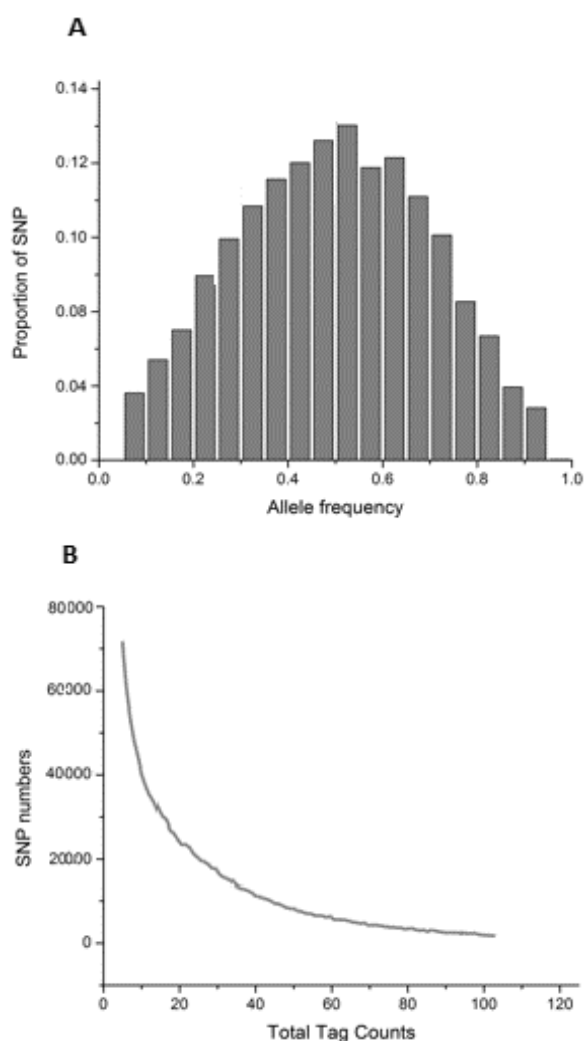


Figura 4.12. (A) Distribución de la frecuencia de los alelos de 864,213 marcadores SNP. **(B)** Distribución de las etiquetas de las 131 muestras del Experimento III.

Para investigar las relaciones genéticas entre los cinco ecotipos, se realizó un análisis utilizando los datos de los marcadores generados por GBS y se desarrolló un árbol filogenético.

La construcción del cladograma se elaboró para revelar su relación filogeográfica usando el programa MEGA 4.0.2, para el cual se usaron los 864,213 marcadores SNP obtenidos de las 131 muestras de los cinco ecotipos de *A. donax* (Figura 4.13). Los árboles por cada ecotipo se muestran

en: Anexo 8.9, Anexo 8.10, Anexo 8.11, Anexo 8.12 y Anexo 8.13. Cada ecotipo se encuentra representado en el árbol con un color y una forma distinta (Piccoplant: celeste; Fondachello: verde; Martinensis: fucsia; Argentum: azul y Granadensis: amarillo). Los valores *bootstrap* variaron de 90 % a 30 %, pero eran en su mayoría valores relativamente altos, superiores al 50 %, lo que nos indicaría altos niveles de soporte.

El árbol muestra las relaciones entre las muestras analizadas a una escala de 0.00 a 0.25.

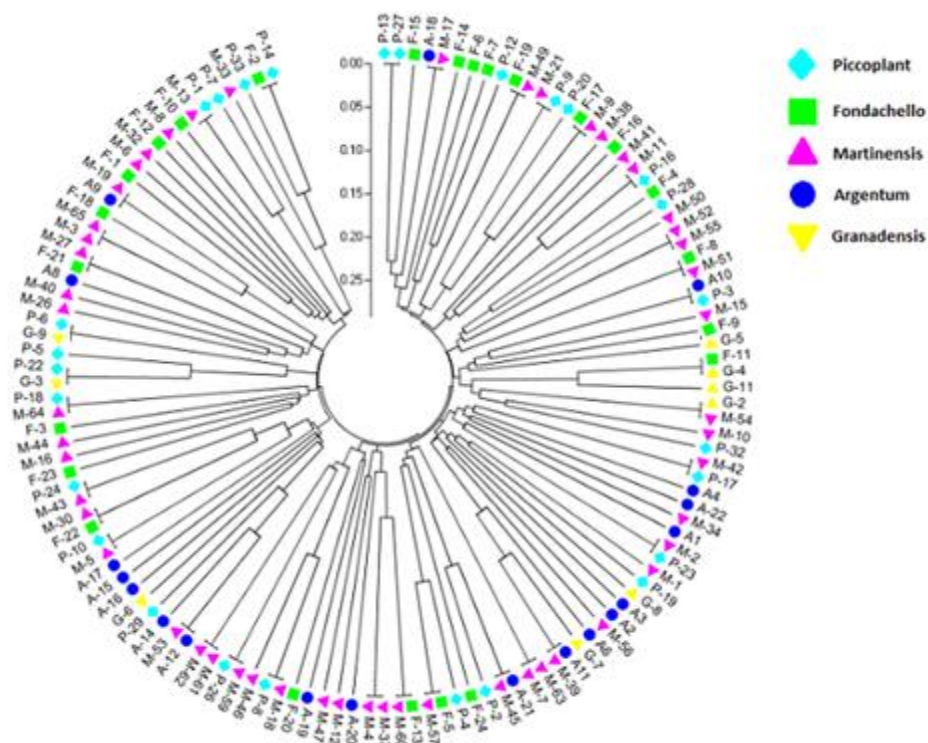


Figura 4.13. Análisis filogenético de 131 muestras de los 5 ecotipos de *A. donax* utilizando los datos de los marcadores generados por GBS. Los diferentes colores representan cada ecotipo.

En este caso, las muestras P13/P27 y las muestras P14/F2 son las que presentan mayor diferencias genéticas al presentarse en cada extremo del árbol. Por el contrario, las muestras P14 y F2, a pesar de ser diferentes ecotipos, pertenecerían al mismo grupo sin diferencias.

A pesar que los cinco ecotipos presentan diferentes números de cromosomas (Tabla 4.15) no se observaron diferencias marcadas entre los ecotipos en el árbol filogenético.

Este resultado también podría proporcionar información sobre la relación entre los diferentes ecotipos para la construcción de mapas genéticos.

5. DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de esta Tesis se propuso tener una visión general y lo más completa posible del comportamiento de *A. donax*. Por ello se planteó un experimento en campo (Experimento I) y dos en invernadero (Experimento II y III), con estrés hídrico como un impacto importante en dos de ellos (Experimento I y II), ya que es uno de los factores ambientales que afectara más negativamente a la productividad en los próximos años, sobre todo en ambientes Mediterráneos (Araus *et al.*, 2002) y así conocer su comportamiento fisiológico, bioquímico y molecular.

5.1. Experimento I: Estudio del efecto del riego en plantas de *Arundo donax* L. en condiciones de campo

Los resultados obtenidos en el experimento de campo proporcionaron información sobre el comportamiento de esta especie en condiciones de clima Mediterráneo. Se ha observado cómo en condiciones de campo (no controladas), algunos parámetros fotosintéticos y la morfología de la planta (producción de biomasa, altura), entre otros, se vieron afectados por las condiciones climáticas a las que se expusieron las plantas durante su crecimiento. En este caso fueron condiciones particulares del clima Mediterráneo, caracterizado por tener inviernos no tan intensos y veranos cálidos y secos, con precipitaciones principalmente durante el otoño y en menor medida en primavera, y períodos considerablemente secos durante el verano (Scordia *et al.*, 2014).

5.1.1. Medidas de crecimiento

Uno de los efectos del riego en *A. donax* fue la mayor producción de biomasa a diferencia de las condiciones de secano donde el rendimiento fue menor (Tabla 4.1), esto como consecuencia del déficit hídrico debido a una menor asimilación de C, que se encuentra relacionado directamente a una menor g_s . Nuestros resultados al igual que los de Nogués *et al.* (2001), Araus *et al.* (2002) y Cattivelli *et al.* (2008) muestran que el comportamiento y la productividad de los cultivos en el ambiente Mediterráneo dependen del

efecto limitante del agua. La capacidad de adaptación de *A. donax* a la falta de agua observada en el experimento de condiciones de secano en campo, se podría atribuir a su gran capacidad de desarrollar sólidos sistemas subterráneos con grandes rizomas y gruesas raíces que penetran hasta una profundidad de 5 m (Perdue, 1958; Frandsen, 1997) llegando fácilmente a fuentes profundas de agua que le proporciona la capacidad resistir a la sequía, como afirma Lewandowski *et al.* (2003).

Según los resultados de Arias (2015), donde experimentó con *Arundo donax* L., *Miscanthus x giganteus* y *Panicum virgatum* L. (estas dos últimas son especies C₄) en condiciones de secano en campo, se destacó un diferente comportamiento entre especies a nivel de crecimiento, siendo *A. donax* la que obtuvo el mejor rendimiento respecto a la biomasa comparada frente a las especies C₄.

5.1.2. Caracterizaciones fisiológicas

Como se ha mencionado anteriormente, el tratamiento de secano afectó la productividad de *A. donax*, debido a la disminución en el CHR en las plantas a lo largo del período de crecimiento en campo. Esto se debería a que, en condiciones de déficit hídrico el contenido de agua de la planta es afectado y las células van perdiendo turgencia. Esta pérdida de turgencia, inhibe actividades como la expansión celular, afectando directamente al crecimiento de toda la planta (Arve *et al.*, 2011) y al cierre de estomas, que tiene efectos negativos en la fotosíntesis, transpiración, absorción agua y de nutrientes (Flexas *et al.*, 2006; Parent *et al.*, 2009). La disminución en la conductancia estomática (g_s) durante el tratamiento de secano en el T₁ como respuesta a la falta de agua estuvo relacionada directamente a la disminución en la tasa de asimilación de CO₂ (A_{sat} , Figura 4.1) y en J_{max} (Figura 4.5), tal y como mencionan Nogués y Baker (2000), Cornic (2000) y Nogués y Alegre (2002), cuyos resultados también se obtuvieron bajo condiciones Mediterráneas. La mayor EUA es resultado de una menor conductancia estomática y por tanto, disminuye la asimilación de CO₂ (Ghannoum, 2009).

Esta afirmación concuerda con los resultados obtenidos en este experimento en condiciones de secano, donde las plantas de *A. donax* fueron más eficientes en el uso del agua (Tabla 4.4) y CHR (Tabla 4.5) respecto al tratamiento de regadío. Es decir, *A. donax* fue tolerante frente a un estrés hídrico severo, tal y como menciona Leegood (1993). En condiciones de secano, se redujeron las tasas de asimilación a medida que se incrementaron los niveles de luz. Pero los valores de F_v/F_m (Tabla 4.2) no disminuyeron en comparación con los datos obtenidos en condiciones de riego, lo que significaría que esta reducción de A_{sat} se debió a la disminución de la g_s (Figura 4.3) y al bajo contenido de c_i , y no a la disminución de la tasa de transporte de electrones fotosintéticos (Cornic *et al.*, 1992). Los altos valores de F_v/F_m en condiciones de secano y la disminución de F_v/F_m a medida que se aumentó el nivel de luz concordaron con los observados por Arias (2015) en la especie *A. donax*.

5.1.3. Análisis moleculares

El rendimiento de cultivos energéticos bajo estrés hídrico es un criterio importante (Fischer y Maurer, 1978) que se puede utilizar como un índice de selección bajo condiciones limitantes de agua.

El rendimiento de la biomasa por estrés hídrico se utiliza a menudo como una estimación de la resistencia en términos de producción del cultivo (Zhang *et al.*, 2015).

En este experimento, se obtuvieron 319,900 marcadores SNP (el cual fue un número alto en el que se pudo evitar el potencial de las secuencias duplicadas mediante la amplificación por PCR), concordando con una distribución normal (Figura 4.7 A). Este resultado demuestra la fiabilidad de los marcadores SNP alcanzados por el GBS. Sin embargo, no se encontró relación entre estos resultados con los resultados fisiológicos. Lamentablemente, no se cuentan hasta el momento con investigaciones similares del uso de GBS en *A. donax*. Sin embargo, Zhang *et al.* (2015) realizó un estudio sobre la identificación de loci asociados a la tolerancia a la sequía,

usando GWAS y GBS en *Medicago sativa*. Una de las ventajas de este estudio es que trabajaron con el genoma de *Medicago truncatula* como referencia. Aunque, recordemos que una de las características del uso de GBS es que no se necesita un genoma de referencia para llevar a cabo esta técnica (Elshire *et al.*, 2011), facilita mucho el trabajo contar con una base para realizar el análisis. Otra ventaja de *M. sativa* es que es un diploide o tetraploide con 16 cromosomas (Bauchan y Hossain, 1998), mientras que *A. donax* es un poliploide con un número de cromosomas no establecido y que varía dependiendo del lugar de origen (Bucci *et al.*, 2012). Así, intentar encontrar genes de referencia en un genoma pequeño es mucho más sencillo que intentar encontrarlos en todo el genoma de *A. donax*, con un número de cromosomas de 110 para Piccoplant (Tabla 4.15).

Los marcadores SNP obtenidos en este experimento fueron de buena calidad y los *bootstrap* reflejaron la fiabilidad de los marcadores obtenidos (45 – 100 %). A pesar de encontrar las muestras del tratamiento R y S dispersas en todo el árbol filogenético, se puede atribuir que los genes de tolerancia a la sequía se encontrarían en ambos tratamientos, activándose sólo cuando se limita el agua, cerrando estomas y alterando algunos parámetros fisiológicos debido a una menor asimilación de C. En *Arabidopsis* por ejemplo, este hecho se encuentra regulado por una serina proteasa subtilisina (SDD1) cuya función consiste en la regulación de la densidad de los estomas, que se ve afectada en situaciones de falta de agua (Berger y Altmann, 2000). Por tanto se puede inferir que estas respuestas a la escases de agua se ven regulados a nivel genético y serviría para hacer más eficiente a la planta (aunque no se ha podido corroborar esta información con nuestros resultados por los inconvenientes mencionados anteriormente).

En un futuro, estos marcadores SNP de alta calidad se podrían utilizar para relacionarlos a genes con la tolerancia a la sequía con más pruebas a nivel de fenotipo utilizando el AD-test para evaluar a través de todo el genoma y poder asociarlo con la tolerancia al estrés hídrico.

Con el desarrollo de tecnología de secuenciación NGS, el coste de la secuenciación se ha reducido considerablemente y dependiendo del cultivo (como es el caso del *Zea mays* L.), un gran número de marcadores necesario para los GWAS ya está disponible a un costo razonable (Xue *et al.*, 2013). Aunque el nivel de la calidad del material genético ahora se puede lograr en algunas líneas diversas usando GWAS (Yan *et al.*, 2009), la técnica sólo ofrece una clave estadística para la correlación de las características (agronómicas, fisiológicas) con sus secuencias genómicas asociadas (Xue *et al.*, 2013), por tanto es necesario validar las asociaciones usando otra evidencia biológica, como por ejemplo la evaluación de proteínas.

5.2. Experimento II: Estudio del efecto del estrés hídrico en plantas de *Arundo donax* L. en condiciones de invernadero

El experimento de invernadero proporcionó información del comportamiento de *A. donax* en condiciones controladas. Por tanto, bajo condiciones de invernadero, se pudieron evaluar, además de las medidas de crecimiento y las caracterizaciones fisiológicas, la composición isotópica de la materia orgánica total (MOT), los azúcares solubles totales (AST) y el almidón (ALM).

5.2.1. Medidas de crecimiento

La limitación del agua afectó considerablemente la producción de biomasa debido a una menor asimilación de C, como consecuencia de una menor g_s . Esto generó disminuciones en parámetros de crecimiento como la altura (Figura 4.9), el peso seco de cada órgano, el peso seco total (PST), la relación entre el peso seco de la parte aérea y el peso seco de la parte subterránea (S/R) y el área foliar (AF; Tabla 4.8).

Los resultados de biomasa, mostraron una disminución del peso seco de la parte aérea más que en la parte subterránea (Tabla 4.8), acercándose a los datos obtenidos por otros autores como Maroco, 2000; Blum, 2005; Munns y Tester, 2008; Mann *et al.*, 2013; Sánchez, 2015. Esto indicaría que el mantenimiento de un buen sistema radicular es importante en condiciones de estrés hídrico con la finalidad de buscar fuentes de agua subterránea (Lewandowski *et al.*, 2003).

El efecto del estrés hídrico no se observó en la altura de las plantas de *A. donax* (Figura 4.9). Sin embargo, uno de los mecanismos de *A. donax* para mantenerse viable frente a la limitación del agua es la modificación de la anatomía de sus hojas, haciéndolas más pequeñas, pero a la vez más gruesas (Erice *et al.*, 2010), tal y como se observó con el descenso de los valores de AFE. Es decir, el estrés hídrico tuvo como consecuencia una disminución de la producción de biomasa de *A. donax* así como alteraciones en la morfología

foliar, generando hojas más pequeñas y a la vez más gruesas (Erice *et al.*, 2010; Sánchez, 2015). El tamaño de la hoja es un carácter de importancia que participa en la producción de biomasa y tolerancia a la sequía, ya que los cultivares con hojas pequeñas reducen la evaporación del agua de la planta a la atmósfera por lo tanto son más tolerantes a la sequía (Ray *et al.*, 1998).

5.2.2. Caracterizaciones fisiológicas

En los resultados del Experimento II se observó el efecto del estrés hídrico, tanto moderado como severo, en *A. donax*, como por ejemplo la disminución de A_{sat} (Tabla 4.9), que es uno de los parámetros fisiológicos más estudiados del estrés hídrico (Cabrera-Bosquet *et al.*, 2007; Chaves *et al.*, 2009; Ashraf y Harris, 2013). Varios estudios sobre la fotosíntesis bajo condiciones de estrés hídrico muestran descensos en A_{sat} y g_s en otras plantas C_3 (Cornic y Massacci, 1996; Escalona *et al.*, 1999) y específicamente en *A. donax* (Mann *et al.*, 2013). Flexas y Medrano (2002) describieron que g_s es un indicador del estado hídrico de la planta y, que es uno de los primeros parámetros afectados por este tipo de estrés (Flexas *et al.*, 2004). El estrés hídrico induce la disminución de g_s y, por consiguiente el cierre estomático generado por el aumento del ácido abscísico (ABA) en las hojas (Mittelheuser y Van Steveninck, 1969), reduciendo la presión parcial interna de CO_2 (c_i) y la fotosíntesis.

Los resultados fisiológicos de este experimento mostraron una alta correlación entre A_{sat} y g_s (Tabla 4.9). Es decir, frente a una limitación de agua, *A. donax* respondió mediante el cierre estomático, disminuyendo la tasa de carboxilación (Flexas *et al.*, 2004). Además, de la disminución de g_s , también se redujeron los valores del CHR (Tabla 4.9; Tabla 4.12). Esta rápida respuesta estomática a la disminución del contenido hídrico del suelo permitiría a las plantas retrasar la pérdida de agua, lo que indicaría que, según esta característica, podrían ser consideradas como especies que evitan la deshidratación (Gulías *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004). A su vez, una mayor EUA frente a déficit hídrico (Tabla 4.11) es otra particularidad que hace a *A. donax*

que sea considerada como una especie tolerante a la sequía (Lewandowski *et al.*, 2003; Stroup *et al.*, 2003; Cosentino *et al.*, 2014).

Además de la EUA y g_s , también existen otros parámetros que aportan información sobre el estado hídrico de la planta, como son el CHR y la discriminación isotópica del ^{13}C . La pérdida de turgencia en las células vegetales como consecuencia del estrés hídrico podría haber generado los descensos en el CHR en *A. donax*, como se observó en esta Tesis (Tabla 4.12) y también en otros estudios (Stroup *et al.*, 2003; Nackley *et al.*, 2014). La mayor correlación entre A_{sat} y g_s que entre A_{sat} y el CHR en *A. donax* indicaría cómo los parámetros relacionados con la fotosíntesis son más dependientes de g_s que del CHR (Sharkey, 1990; Medrano *et al.*, 2002).

De acuerdo a Cornic y Massacci (1996), el daño bioquímico en el aparato fotosintético es significativo solamente cuando el déficit hídrico en la hoja alcanza el 30 %. Por lo tanto, de acuerdo a nuestros resultados, *A. donax* redujo su CHR como consecuencia del déficit hídrico, pero no habría experimentado daño en el aparato fotosintético ya que nuestros resultados difieren de ese valor. Al igual que en el experimento de campo, los valores constantes de F_v/F_m (Tabla 4.10) indicaría que los procesos de transporte electrónico no fueron afectados por el estrés hídrico ni se produjo fotoinhibición en los centros de reacción del PSII (Lawlor y Cornic, 2002). Este hecho confirmaría que la reducción de A_{sat} se debió a la disminución de g_s , y no a la disminución de la tasa de transporte electrónico (Cornic *et al.*, 1992), resultados que concuerdan con los observados por Sánchez (2015) en *A. donax*.

5.2.3. Análisis isotópico

Los isótopos estables son una herramienta útil para conocer el metabolismo de la planta, particularmente cómo el CO_2 es asimilado (Tcherkez y Hodges, 2008) y cómo distribuyen en los órganos de las plantas hasta formar las reservas.

En esta Tesis se observó, que el CO₂ respirado por las hojas en la oscuridad ($\delta^{13}\text{C}_R$) en el T0 (Tabla 4.13) estuvo empobrecido en ¹³C en comparación con la composición isotópica del aire (-11.44 ‰ ± 0.12) y enriquecido en comparación con la materia orgánica ($\delta^{13}\text{C}_{MOT}$; Tabla 4.13). Es decir, los valores más positivos de $\delta^{13}\text{C}_R$ comparado con $\delta^{13}\text{C}_{MOT}$ en el T0 (para cada tratamiento y órgano) implicaron una menor discriminación del ¹³C durante la respiración, de acuerdo a Ghashghaie *et al.* (2001, 2003), Tcherkez *et al.* (2003) y Nogués *et al.* (2004).

A diferencia de lo reportado por Badeck *et al.* (2005), nuestros resultados (Tabla 4.13) no mostraron diferencias significativas en la composición isotópica de MOT de los diferentes órganos ($\delta^{13}\text{C}_{MOT}$) bajo condiciones control, no observándose por tanto discriminación posfotosintéticas.

Según Ghashghaie *et al.* (2003) y Nogués *et al.* (2004), los AST son los sustratos respiratorios más enriquecidos en ¹³C en algunas especies C₃. Sin embargo, no se observó este comportamiento en los AST ($\delta^{13}\text{C}_{AST}$) respecto a la MOT ($\delta^{13}\text{C}_{MOT}$; Tabla 4.13) de *A. donax*. Por el contrario, se observó un enriquecimiento en ¹³C en el CO₂ respirado ($\delta^{13}\text{C}_R$) de entre 4 ‰ a 10 ‰ en comparación con los azúcares solubles ($\delta^{13}\text{C}_{AST}$) en el T0. Estos resultados se sitúan dentro del rango esperado en otras especies C₃ (ca. 6 ‰) según Duranceau *et al.* (1999) y Nogués *et al.* (2004).

En el ALM se observó un comportamiento muy similar entre los obtenidos ($\delta^{13}\text{C}_{ALM}$) respecto a la MOT ($\delta^{13}\text{C}_{MOT}$; Tabla 4.13) de *A. donax*, pero se observó un enriquecimiento en ¹³C en el CO₂ respirado ($\delta^{13}\text{C}_R$) de entre 3 ‰ a 10 ‰ en comparación con el almidón ($\delta^{13}\text{C}_{ALM}$). Nuestros resultados concuerdan con los resultados de Ghashghaie *et al.* (2001) y Nogués *et al.* (2004) obtenidos en especies como en *Nicotiana sylvestris*, *Helianthus annuus* y *Phaseolus vulgaris*, donde se encontraron niveles de -28 ‰ aproximadamente en condiciones control.

El enriquecimiento en ^{13}C observado en $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$, en $\delta^{13}\text{C}_{\text{AST}}$, en $\delta^{13}\text{C}_{\text{ALM}}$ y en $\delta^{13}\text{C}_{\text{R}}$ a las 24 horas de realizar el marcaje isotópico con $^{13}\text{CO}_2$ (T1) demuestra que las plantas asimilaron el ^{13}C mediante la fotosíntesis y lo incorporaron a los procesos de translocación, de almacenamiento y de respiración. Respecto a los órganos estudiados, se observó cómo, tras el marcaje (T1), el tallo fue el órgano cuya MOT, AST y ALM (Tabla 4.13) estuvo más enriquecido en ^{13}C y podría deberse a que se estaría actuando como órgano de transporte de fotoasimilados enriquecidos hacia los puntos de crecimiento (Brugnoli & Farquhar, 2000) o como un órgano sumidero de C de tipo temporal. Esta acumulación de azúcares (principalmente sacarosa) y almidón, se ha observado en algunas especies C_4 de la familia Poaceae, subfamilia Panicoideae como el sorgo (*Sorghum bicolor*) y la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*; Jaradat, 2010; Slewinski, 2012; Bihmidine *et al.*, 2013). El rizoma fue otro de los órganos con mayor marcaje isotópico, confirmando la hipótesis de que el rizoma actuaría como un órgano sumidero de C (Aljazairi *et al.*, 2015; Mann *et al.*, 2013).

Dado que los valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$, de $\delta^{13}\text{C}_{\text{AST}}$, de $\delta^{13}\text{C}_{\text{ALM}}$ y de $\delta^{13}\text{C}_{\text{R}}$ (Tabla 4.13) a los diez días después del marcaje (T2) en condiciones control se mantuvieran todavía enriquecidos con ^{13}C , nos indica que las hojas, tallos, raíces y rizomas no habrían perdido todo el ^{13}C a través de la respiración mitocondrial (Nogués *et al.*, 2004), indicando que el ^{13}C se encontraba aún presente en estos órganos de la planta. Para retornar a los valores iniciales de ^{13}C (T0) se requería más tiempo hasta su completo metabolismo.

En el T2, el tallo y el rizoma continuaron siendo, en general, los órganos más enriquecidos en ^{13}C , confirmando el papel de ambos órganos como sumideros temporales y permanentes de C, respectivamente. Una de las razones por que los tallos podrían actuar como órganos de reserva, es que al ser tejidos fotosintéticamente activos fijarían ^{13}C directamente, incorporándolo a sus tejidos (Cernusak *et al.*, 2001; Ghashghaie y Badeck, 2014).

También se pudo observar que cuanto más se limitaba el agua, en la mayoría de casos, las muestras estuvieron más enriquecidas en ^{13}C , tanto en materia orgánica total, azúcares, C respirado, datos que concuerdan con los reportados por Sánchez (2015) y también en almidón. Esto se debe principalmente a que cuando una planta está bajo condiciones de estrés, sufre un menor proceso de discriminación del ^{13}C (Ghashghaie *et al.*, 2014).

5.3. Experimento III: Estudio molecular de cinco ecotipos de *Arundo donax* L.

5.3.1. Medidas de crecimiento

Los resultados del Experimento III, mostraron un comportamiento normal de crecimiento de las plantas en el invernadero. Los resultados obtenidos en este experimento, en condiciones control fueron similares a los resultados de los tratamientos controles de los Experimentos I y II. Los resultados mostrados en la Tabla 4.14, muestran además los pesos promedio por muestra, donde el ecotipo Granadensis presentó el mayor peso, mientras que Piccoplant presento el peso más bajo. Por ello, se realizó una caracterización a nivel morfológico de los cinco ecotipos de *A. donax* en condiciones controladas y óptimas de crecimiento. El ecotipo Granadensis, mostró tres características marcadas en las hojas a nivel morfológico a diferencia de los otros cuatro ecotipos: tenía hojas más pequeñas, más gruesas y más verdes. Esto podría deberse a su origen, ya que esta planta silvestre, fue recolectada cerca de una playa de Granada (Andalucía) lo cual podría indicar cierta tolerancia a la salinidad y, para ello podría adoptar ciertos cambios morfológicos a nivel foliar para evitar la pérdida de agua (Erice *et al.*, 2010). Además, el color más intenso de sus hojas, estaría relacionado a la cantidad de clorofilas que puede relacionarse con lo obtenido con el SPAD (Anexo 8.5), donde se observa una cantidad mayor a diferencia de los otros cuatro ecotipos, pero sin diferencias significativas. Sin embargo, el ecotipo Piccoplant, que fue proporcionado por una empresa privada, era una planta que se encontraba en buenas condiciones de crecimiento y no necesitaría realizar cambios a nivel morfológico para adaptarse a las condiciones adversas (Erice *et al.*, 2010; Sánchez, 2015).

5.3.2. Análisis moleculares

La extracción de ADNg tuvo buenos resultados, casi sin pérdidas de muestras en un periodo muy corto de tiempo, lo cual facilitó el trabajo de un número

elevado de muestras a analizar. La extracción de ADN de manera convencional puede tardar aproximadamente dos días para un número limitado de muestras, con lo cual el protocolo que se expone en este trabajo es ideal para un número de individuos alto como el presentado en este trabajo. Además, el desarrollo de UNEAK y GWAS tienen el potencial de mejorar la eficacia de los programas de análisis a nivel molecular y del futuro mejoramiento genético de las poblaciones (Bernardo y Yu, 2007) de interés económico. Además de disminuir los costes (por ejemplo: nos permitió reducir en un 96.9 % el número de muestras, lo que permitió optimizar el uso de los reactivos y materiales de plástico) y aumentar el rendimiento de secuenciación, han permitido descubrir SNPs a gran escala en muchas especies, particularmente aquellas que son importantes en la actual economía agrícola, que están bien caracterizados genéticamente y ya cuentan genomas de referencia Lu *et al.* (2013). El análisis de los marcadores SNPs por medio del NGS puede ser particularmente difícil en ausencia de un genoma de referencia, aunque como ya se ha mencionado anteriormente no es un limitante si no se cuenta con un genoma de referencia (Elshire *et al.*, 2011), como es el caso de la mayoría de las gramíneas perennes para biomasa.

En este experimento, trabajamos sobre la base de 864,213 marcadores SNP de alta calidad, que concuerda con una distribución normal (Figura 4.12 A). Este resultado, al igual que el caso anterior, demuestra la fiabilidad de los marcadores SNP alcanzados por el GBS, apoyándose también en los *bootstraps* que estuvieron en un rango de 90 – 30 %. Sin embargo, no se encontraron clados por ecotipo evaluado en el árbol filogenético (Figura 4.13). Como en el caso anterior, no se cuenta hasta el momento con información del uso de GBS en *A. donax*. Sin embargo, un estudio similar en *Panicum virgatum* L. se llevó a cabo por Lu *et al.* (2013) para determinar la diversidad genética y la ploidía del cultivo basado en GBS. Esta investigación es la que más se asemeja a nuestro estudio, en primer lugar por ser una Poaceae al igual que *A. donax* y en segundo lugar por tener un nivel de

ploidía elevado (tetraploide generalmente, aunque se han identificado octaploides) y un número de cromosomas relativamente alto (72 cromosomas; Williams y Auer (2014)). En el estudio de Lu *et al.* (2013) se usaron 29,221 marcadores SNP de 540 individuos para construir un árbol filogenético, que representa un 3.4 % de nuestros marcadores, haciendo mucho más sencilla la construcción del árbol y el posicionamiento de las muestras en el mismo, mostrándose de manera ordenada por la localización del muestreo.

En general, se esperaba que cada ecotipo se mostrara como un clado. Sin embargo, no hubo una clara diferenciación de grupos, dando como resultado que la mayoría de muestras se mezclaron. Este hecho se podría atribuir a los diferentes tipos de ploidía que al no ser homogéneos en todos los ecotipos se mostrarían aislados o dispersos como en el caso de *P. virgatum* (Martinez-Reyna y Vogel, 2002). En nuestro caso, además se podría atribuir también al alto número de SNP trabajados y que algunos rasgos pueden poseer arquitecturas muy complejas además de las dificultades que podría presentar el GWAS (que un rasgo sea controlado por muchas variantes raras o por el contrario, por muchas variantes comunes). En ambos casos, las variantes causales pueden ser agrupadas en uno o un pequeño número de genes o a través de muchos genes que se podría relacionar con el número de cromosomas encontrado en este experimento para cada ecotipo o al número de muestras, aunque esto último no siempre es una desventaja (Korte y Farlow, 2013).

Por tanto, la capacidad de predecir los rasgos agronómicamente importantes como la tasa de crecimiento o el rendimiento de los cultivos requiere una comprensión tanto genética como fenotípica (Korte y Farlow, 2013).

5.3.3. Conteo de cromosomas

Hasta la fecha, el número de cromosomas de *A. donax* no ha sido determinado con precisión, debido al pequeño tamaño y al alto número de cromosomas de la especie. Efectivamente, varios autores han reportado

diferentes números de cromosomas de *A. donax*. Por ejemplo: Avdulov (1931) observó 100 cromosomas; mientras Vittoria (1958) informó en tres diferentes conteos en metafase: 24; 48 y 96 cromosomas; Hunter (1934), Pizzolongo (1962) y Bucci *et al.* (2013) observaron 110 cromosomas; Christopher y Abraham (1971) informaron 108 cromosomas; mientras Mariani *et al.* (2010) informaron el número de 40 cromosomas y, más recientemente Haddadchi *et al.* (2013) reportaron 84 cromosomas.

Así, nuestros resultados (Tabla 4.15) indican que los podemos dividir en tres grupos: 1) Granadensis (98 cromosomas) cercano al número 100 reportado por Avdulov (1931); 2) Piccoplant y Martinensis (110 y 116 cromosomas respectivamente), relacionados con los 110 cromosomas de acuerdo a lo observado por Hunter (1934), Pizzolongo (1962) y Bucci *et al.* (2013) y, 3) Argentum y Fondachello que sobrepasan el número reportado por los autores antes mencionados. Estos nuevos datos podrían ser debido a que estos ecotipos hayan ganado cromosomas a lo largo del tiempo o al tratamiento de los ápices de la raíz con hidroxiquinolina, ya que se ha descrito que este químico puede incrementar de forma significativa el número de metafases (Bucci *et al.*, 2013).

El número cromosómico básico de *A. donax* de plantas nativas de China, según Liang y Phillips (2006) es $x=12$. Por tanto, nuestros resultados, muestran recuentos cercanos al número octaploide, nonaploide y decaploide: $2n=8x=96$; $2n=9x=108$ y $2n=10x=120$ respectivamente.

Además, Bucci *et al.* (2013) explican que la infertilidad de *A. donax* podría estar relacionada a su origen filogenético y a su vez, estar estrechamente relacionada a su número de cromosomas. Dos hipótesis se han planteado al respecto (ambas con *Arundo plinii* –72 cromosomas– como antecesor) suponiendo que el número de cromosomas de *A. donax* fuera de 110. La primera hipótesis explica que un tetraploide fértil de *A. plinii* (144 cromosomas) se cruzó con un diploide de la misma especie (72 cromosomas) dando como resultado un triploide estéril (108 cromosomas). Finalmente, el nuevo espécimen ganó dos cromosomas como resultado de aneuploidía, así

se obtuvo un total de 110 cromosomas. La segunda hipótesis explica que el tetraploide fértil de *A. plinii* (144 cromosomas) se cruzó con *Phragmites australis* (96 cromosomas). Finalmente, el nuevo espécimen perdió diez cromosomas como resultado de aneuploidía, obteniéndose un total de 110 cromosomas. De acuerdo a nuestros resultados, el número de cromosomas encontrado puede situarse dentro de las hipótesis de Bucci *et al.* (2013). Finalmente, estas hipótesis pueden ayudar a explicar la variabilidad cromosómica de *A. donax* en la cual, el número de cromosómico, el origen y la causa de la esterilidad de la caña común, siguen siendo preguntas sin resolver.

6. CONCLUSIONES

6.1. Experimento I

- La menor productividad de *A. donax* en condiciones de secano a diferencia del tratamiento en regadío, podría estar asociada a las menores tasas de asimilación debido a que la conductancia estomática y el proceso de carboxilación del ciclo de Calvin se vieron muy afectados por la falta de agua.
- En condiciones de secano no disminuyó el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (F_v/F_m), lo cual indicaría que no se vieron afectados dos procesos que tienen lugar en la membrana tilacoidal: el transporte electrónico y la fotofosforilación.
- *A. donax* en condiciones de regadío como en condiciones de secano, presentó diferencias en cuanto a producción de biomasa. Sin embargo, a pesar del déficit hídrico *A. donax* podría ser una opción viable para ser utilizada como cultivo energético en el ambiente Mediterráneo por su alto rendimiento.
- La ausencia de diferencias a nivel genético entre condiciones de regadío y de secano podría ser debido a que los genes de tolerancia a la sequía se expresan solo en condiciones de estrés hídrico.

6.2. Experimento II

- La disminución de la tasa fotosintética (A_{sat}) así como de otros parámetros fotosintéticos y la optimización de la EUA en condiciones de estrés hídrico son regulados principalmente por la conductancia estomática (g_s).
- Se evidenciaron variaciones morfológicas a nivel foliar cuando la planta era sometida a sequía, lo que indicaría una estrategia aclimatativa a las condiciones adversas.

- El enriquecimiento significativo del tallo y el rizoma en ^{13}C indicaría que ambos órganos asumirían el rol de sumideros de carbono, de manera temporal y permanente, respectivamente.

6.3. Experimento III

- En esta Tesis se propone, por primera vez, un protocolo de extracción de ADNg para los análisis moleculares en *A. donax*.
- El protocolo de *Genotyping by sequencing* es viable para genomas sin referencia como el caso de *A. donax*.
- Al relacionar los datos obtenidos de medidas de crecimiento y contenido de clorofilas con los análisis moleculares, se puede concluir que no hay diferencias marcadas a nivel genético entre ecotipos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Alison, M.N.**, Raman, S. 2013. Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second-generation biofuels. *Energy Policy*, 63: 114-122.
- **Aljazairi, S.**, Arias, C.V., Nogués, S. 2015. Carbon and nitrogen allocation and partitioning in traditional and modern wheat genotypes under pre-industrial and future CO₂ conditions. *Plant Biology*, 17(3): 647 - 659.
- **Angelini, L.G.**, Ceccarini, N., Di Nasso, N. Bonari, E. 2009. Comparison of *Arundo donax* L. and *Miscanthus x giganteus* in a long-term field experiment in Central Italy: Analysis of productive characteristics and energy balance. *Biomass and Bioenergy*, 33(4): 635-643.
- **Araus, J.L.**, Slafer, G.A., Reynolds, M.P. Royo, C. 2002. Plant breeding and water relations in C₃ cereals: what should we breed for? *Annals of Botany*, 89: 925-940.
- **Arias, C.V.** 2015. Gramíneas perennes C₃ y C₄ para la producción de bioenergía en ambiente Mediterráneo. Memoria para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona, 180 pp.
- **Arve, L.E.**, Torre, S, Olsen, JE, Tanino, KK. 2011. Stomatal responses to drought stress and air humidity, abiotic stress in plants - Mechanisms and Adaptations, Arun Shanker (Ed.), In Tech.
- **Arvizu, D.**, Bruckner, T., Chum, H., Edenhofer, O., Estefen, S., Faaij, A., Fishedick, M., Hansen, G., Hiriart, G., Hohmeyer, O., Hollands, K.G.T., Huckerby, J., Kadner, S., Killingtonveit, Å., Kumar, A., Lewis, A., Lucon, O., Matschoss, P., Maurice, L., Mirza, M., Mitchell, C., Moomaw, W., Moreira, J., Nilsson, L.J., Nyboer, J., Pichs-Madruga, R., Sathaye, J., Sawin, J., Schaeffer, R., Schei, T., Schlömer, S., Seyboth, K., Sims, R., Sinden, G., Sokona, Y., von Stechow, C., Steckel, J., Verbruggen, A., Wiser, R., Yamba, F., Zwickel, T. 2011: Technical Summary. In IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation [Edenhofer, O., Pichs-Madruga, R., Sokona, Y., Seyboth, K., Matschoss, P., Kadner, S., Zwickel, T., Eickemeier, P., Hansen, G., Schlömer, S., von Stechow, C. (eds)]. 2011. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- **Ashraf, M.**, Harris, PJC. 2013. Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica*, 51: 163-190.
- **Avdulov, N.** 1931. Karyosystematische untersuchung der familie Gramineem, *Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding*, 44.
- **Badeck, F.W.**, Tcherkez, G., Nogués, S., Piel, C., Ghashghaie, J. 2005. Post-photosynthetic fractionation of stable isotopes between plant organs- a widespread phenomenon. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19: 1381- 1391.
- **Barney, J.N.**, Mann, J.J., Kyser, G.B., Blumwald, E., Van Deynze, A., DiTomaso, J.M. 2009. Tolerance of switchgrass to extreme soil moisture stress: Ecological implications. *Plant Science*, 177 (6): 724-732.
- **Bauchan, G.R.**, Hossain, M.A. 1998. Karyotypic analysis of N-banded chromosomes of diploid alfalfa: *Medicago sativa* ssp. caerulea and ssp. falcata and their hybrid. *The Journal of Heredity*, 88 (6).

- **Bayer, E.,** Buttler, K.P., Finkenzeller, X., Grau, J. 1989. Plantas del Mediterráneo. Barcelona, España. Editorial Blume, 288 pp.
- **Berger, D.,** Altmann, T. 2000. A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development* 14:1119–1131.
- **Bernardo, R.,** Yu, J. 2007. Prospects for Genomewide Selection for Quantitative Traits in Maize. *Crop Science*, 47: 1082–1090.
- **Bihmidine, S.,** Hunter, C.T., Johns, C.E., Koch, K.E. Braun, D.M. 2013. Regulation of assimilate import into sink organs: update on molecular drivers of sink strength. *Frontiers in Plant Science*, 4, 177.
- **Blum, A.** 2005. Drought resistance, water-use efficiency and yield potential - are they compatible, dissonant or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research*, 56, 1159-1168.
- **Brugnoli, E.,** Farquhar, G.D. 2000. Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. In: Leegood RC, TD Sharkey and Von Caemmerer S (Eds.) *Photosynthesis: physiology and metabolism. Advances in photosynthesis.* Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 399 - 434 pp.
- **Bucci, A.,** Cassiani, E., Landoni, M., Cantaluppi, E., Pilu, R. 2013. Analysis of Chromosome Number and Speculations on the Origin of *Arundo donax* L. (Giant Reed). *Cytology and Genetics*, 47 (4): 237-241.
- **Cabrera-Bosquet, L.,** Molero, G., Bort, J., Nogués, S., Araus, J.L. 2007. The combined effect of constant water deficit and nitrogen supply on WUE, NUE and ¹³C in durum wheat potted plants. *Annual of Applied Biology*, 151: 277-289.
- **Cattivelli, L.,** Rizza, F., Badeck, F.W., Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A.M. 2008. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research*, 105: 1-14.
- **CCSP.** 2008. The effects of climate change on agriculture, land resources, water resources, and biodiversity in the United States. In: *Research USCCSPatSoGC*, editor. Washington, DC: US Department of Agriculture; 362 pp.
- **Ceotto, E.,** Candili, D., Castelli, F., Badeck, F.W., Rizza, F., Soave, C., Volta, A., Villani, G., Marletto, V. 2013. Comparing solar interception and use efficiency for the energy crops giant reed (*Arundo donax* L.) and sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Field Crops Research*, 149: 159-166.
- **Cernusak L.,** Marshall, J., Comstock, J., Balster, N. 2001. Carbon isotope discrimination in photosynthetic bark. *Oecologia*, 128 (1): 24-35.
- **Charles, M.,** Ryan, R., Ryan, N., Oloruntoba, R. 2007. Public policy and biofuels: The way forward? *Energy Policy*, 35: 5737-5746.
- **Chaves, M.,** Flexas, J., Pinheiro, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103: 551-560.

- **Christopher, I.**, Abraham, A. 1971. Studies on the cytology and phylogeny of South Indian grasses. I. Bambu soideae, Oryzoideae, Arundinoideae and Festucoideae, *Cytologia*, 36: 579-594.
- **Cook, C.D.K.** 1990. Aquatic Plant Book. SPB Academic Publishing, The Hague. The Netherlands, 220 pp.
- **Cornic, G.**, Ghashghaie, J., Genty, B., Briantais, J.M. 1992. Leaf photosynthesis is resistant to mild drought stress. *Photosynthetica*, 27: 295-309.
- **Cornic, G.**, Massacci, A. 1996. Leaf photosynthesis under drought stress. In N. Baker, *Photosynthesis and the environment* (pages 347-366). Dordrech: Kluwer Academic.
- **Cornic, G.** 2000. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. *Trends in plant science*. 5: 197-188.
- **Cosentino, S.**, Copani, V., D'Agosta, G.M., Sanzone, E. Mantineo M. 2006. First results on evaluation of *Arundo donax* L. clones collected in Southern Italy. *Industrial Crop Production*, 23: 212-222.
- **Cosentino S.**, Scordia, D., Sanzone, E., Testa, G., Copani, V. 2014. Response of giant reed (*Arundo donax* L.) to nitrogen fertilization and soil water availability in semi-arid Mediterranean environment. *European Journal of Agronomy*, 60: 22-32.
- **Directiva 2009/28/EC, 2009.** Directive of the European Parliament and of the Council of 23 April 2009 on the promotion of the use of energy from renewable sources and amending and subsequently repealing Directives 2001/77/EC and 2003/30/EC.
- **Duranceau, M.**, Ghashghaie, J., Badeck, F., Deleens, E., Cornic, G. 1999. $\delta^{13}\text{C}$ of CO_2 respired in the dark in relation to $\delta^{13}\text{C}$ of leaf carbohydrates in *Phaseolus vulgaris* L. under progressive drought. *Plant, Cell and Environment*, 22 (5): 515-523.
- **EBTP.** European Biofuels Technology Platform. 2015. <http://www.biofuelstp.eu/> (Revisado: 22/09/2015).
- **Elshire, R.J.**, Glaubitz, J.C., Sun, Q., Poland, J.A., Kawamoto, K., Buckler, S., Mitchell, S. 2011. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLoS ONE* 6 (5).
- **Erice, G.**, Louahlia, S., Irigoyen, J., Sánchez-Díaz, M. Avice, J. 2010. Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequently recovery. *Journal of Plant Physiology*, 167 (2), 114-120.
- **Escalona, J.**, Flexas, J., Medrano, H. 1999. Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26: 421-433.
- **European Bioinformatics Institute (EBI).** <http://www.ebi.ac.uk/> (Revisado: 15/10/2014).

- **Farquhar, G.D., O'Leary, M.H., Berry, J.A.** 1982. On the Relationship between Carbon Isotope Discrimination and the Intercellular Carbon Dioxide Concentration in Leaves. *Australian Journal Plant Physiology*, 9 (2): 121-137.
- **Fischer, R.A., Maurer, R.** 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars 1. Grain yield response. *Australian Journal of Agricultural Research* 29 (5):897–912.
- **Flexas, J. & Medrano, H.** 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C₃ plants: Stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany*, 89: 183-189.
- **Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., Sharkey, T.** 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C₃ plants. *Plant Biology*, 6: 269-279.
- **Flexas, J., Ribas-Carbo, M., Bota, J., Galme, S.J., Henkle, M., Martínez-Cañellas, S., Medrano, H.** 2006. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytologist*, 172: 73–82.
- **Framework Convention on Climate Change (FCCC).** United Nations. 2015. Paris Agreement. <http://unfccc.int/resource/docs/2015/cop21/eng/l09r01.pdf> (Revisado: 23/12/2015).
- **Frandsen, P.R.** 1997. Team *Arundo*: interagency cooperation to control Giant Reed cane (*Arundo donax*). In: James OL, Thierrt JW (eds) Assessment and management of plant invasions. Springer, New York, 244–247 pp.
- **Genome Glossary.** 2003. http://web.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/glossary.shtml (Revisado: 22/10/2015).
- **Ghannoum, O.** 2009. C₄ photosynthesis and water stress. *Annals of Botany*, 103 (4): 635-644.
- **Ghashghaie, J., Duranceau, M., Badeck, F., Cornic, G., Adeline, M. & Deleens, E.** 2001. $\delta^{13}\text{C}$ of CO₂ respired in the dark in relation to leaf metabolites: comparisons between *Nicotiana sylvestris* and *Helianthus annuus* under drought. *Plant, Cell and Environment*, 24, 505-515.
- **Ghashghaie, J., Badeck, F., Lanigan, G., Nogués, S., Tcherkez, G., Deléens, E., Cornic, G., Griffiths, H.** 2003. Carbon isotope fractionation during dark respiration and photorespiration in C₃ plants. *Phytochemistry Review*, 2 (1): 145-161.
- **Ghashghaie, J., Tcherkez, G.** 2013. Isotope ratio mass spectrometry technique to follow plant metabolism: Principles and applications of ¹²C/¹³C isotopes. *Advances in Botanical Research* 67: 377-405.
- **Ghashghaie, J., Badeck, F.** 2014. Opposite carbon isotope discrimination during dark respiration in leaves versus roots - a review. *New Phytologist*, 201 (3): 751-769.

- **Gidekel, M.**, Barrientos, L. 1999. Métodos en biología molecular vegetal. Serie Acta N° 1. Chile.
- **Gulías, J.**, Flexas, J., Abadía, A., Medrano, H. 2002. Photosynthetic responses to water deficit in six Mediterranean sclerophyll species: possible factors explaining the declining distribution of *Rhamnus ludovici-salvatoris*, an endemic Balearic species. *Tree Physiology*, 22: 687-697.
- **Haddadchi, A.**, Gross, C.L., Fatemi, M. 2013. The expansion of sterile *Arundo donax* (Poaceae) in southeastern Australia is accompanied by genotypic variation. *Aquatic Botany* 104: 153-161.
- **Hoagland, D.R.**, Arnon, D.I. 1950. The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station, Circular N° 347.
- **Hunter, A.** 1934. A Karyo systematic investigation in Gramineae. *Canadian Journal of Research*, 11: 213-241.
- **Idris, S.**, Jones, P., Salzman, S., Croatto, G., Allinson, G. 2012. Evaluation of the giant reed (*Arundo donax* L.) in horizontal subsurface flow wetlands for the treatment of recirculating aquaculture system effluent. *Environmental Science and Pollution Research*, 19 (4): 1159-1170.
- **IEO.** International Energy Outlook. 2014. <http://www.eia.gov/forecasts/ieo/>. (Revisado: 22/09/2015).
- **IPCC.** 2007. Climate Change 2007. Synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva, Switzerland, 104 p.
- **IPCC.** 2011. Summary for Policymakers. In: IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation [O. Edenhofer, R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, K. Seyboth, P. Matschoss, S. Kadner, T. Zwickel, P. Eickemeier, G. Hansen, S. Schlömer, C. von Stechow (eds)], Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- **IPCC.** 2014. Summary for Policymakers, In: Climate Change 2014, Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (AR5) [Edenhofer, O., R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, E. Farahani, S. Kadner, K. Seyboth, A. Adler, I. Baum, S. Brunner, P. Eickemeier, B. Kriemann, J. Savolainen, S. Schlömer, C. von Stechow, T. Zwickel and J.C. Minx (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- **Jaradat, A.A.** 2010. Genetic resources of energy crops: Biological systems to combat climate change. *Australian Journal of Crop Science*, 4 (5), 309-323.
- **Keeling, C. D.**, Piper, S. C., Bacastow, R. B., Wahlen, M., Whorf, T. P., Heimann, M., and Meijer, H. A. 2001. Exchanges of atmospheric CO₂ and ¹³CO₂ with the terrestrial biosphere and oceans from 1978 to 2000. I. Global aspects, SIO Reference Series, No. 01-06, Scripps Institution of Oceanography, San Diego, 88 pp.

- **Kiniry, J.R.**, Jhonson, M.V.V., Bruckerchoff, S.B., Kaiser, J.U., Cordsiemon, R.L., Harmel, R.D. 2012. Clash of the titans: comparing productivity via radiation use efficiency for two grasses giants of the biofuel field. *Bioenergy Research*, 5: 41-48.
- **Korte, A.**, Farlow, A. 2013. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods*, 9:29.
- **Lasorella, M.V.**, Monti, A., Alexopoulou, E., Riche, A., Sharma, N., Cadoux, K., Van Diepen, K., Elbersen, B., Atzema, A., Elbersen, W. 2011. Yield comparison between switchgrass and miscanthus based on multi-year side by side comparison in Europe. In: 19th European biomass conference & exhibition, 6-10 June Berlin. Germany.
- **Lawlor, D.**, Cornic, G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment*, 25: 275-294.
- **Leegood, R.C.** 1993. Carbon dioxide-concentrating mechanisms. In *Plant Biochemistry and Molecular Biology* (ed. P. J. Lea & R. C. Leegood). John Wiley & Sons Chichester, UK, pp. 47-72.
- **Lewandowski, I.**, Scurlock, J., Lindvall, E., Christou, M. 2003. The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass Bioenergy*, 25: 335-361.
- **Li, F.**, Kang, S., Zhang, J. 2004. Interactive effects of elevated CO₂, nitrogen and drought on leaf area, stomatal conductance and evapotranspiration of wheat. *Agricultural Water Management*, 67: 221-233.
- **Liang, L.**, Phillips, S.M. 2006. Flora of China, Poaceae 115. *Arundo* Linnaeus, Sp. Pl. 1: 81. 1753. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- **Lu, F.**, Lipka, A.E., Glaubitz, J., Elshire, R., Cherney, J.H., Casler, M., Buckler, E., Costich, D. 2013. Switchgrass Genomic Diversity, Ploidy, and Evolution: Novel Insights from a Network-Based SNP Discovery Protocol. *PLoS Genet* 9(1).
- **Lynd, L.R.**, Lave, L., Greene, N. 2003. Cellulosic ethanol fact sheet. National Commission on Energy Policy Forum: The Future of Biomass and Transportation. Washington, DC. In: www.energycommission.org/files/ (Revisado: 15/03/2015)
- **Mann, J.**, Barney, J., Kyser, G., DiTomaso, J. 2013. *Miscanthus x giganteus* and *Arundo donax* shoot and rhizome tolerance of extreme moisture stress. *Global Change Biology Bioenergy*, 5: 693-700.
- **Margalef, R.** 1980. La biósfera, entre la termodinámica y el juego. Barcelona: Ediciones Omega. ISBN 84-282-0585-X.
- **Mariani, C.**, Cabrini, R., Danin, A., *et al.* 2010. Origin, diffusion and reproduction of the giant reed (*Arundo donax* L.) : a promising weedy energy crop, *Annals of Applied Biology* 157 (2): 191-202.
- **Maroco, J.P.**, Pereira, J.S., Chaves, M. 2000. Growth, photosynthesis and water-use efficiency of two C₄ Sahelian grasses subjected to water deficits. *Journal of Arid Environments*, 45: 119-137.

- **Martínez-Reyna, J.M.,** Vogel, K.P. 2002. Incompatibility Systems in Switchgrass. *Crop Science* 42: 1800–1805.
- **McKendry, P.** 2002. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technology* 83: 37-46.
- **McLaughlin, S.B.,** Kszos, L.A. 2005. Development of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) as a bioenergy feedstock in the United States. *Biomass and Bioenergy*, 28: 515-535.
- **McMurtrie, R.E.,** Wang, Y.P. 1993. Mathematical models of the photosynthetic responses of tree stands to rising CO₂ concentrations and temperatures. *Plant, Cell and Environment* 16, 1-3.
- **Medrano, H.,** Escalona, J., Bota, J., Gulías, J., Flexas, J. 2002. Regulation of photosynthesis of C₃ plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany*, 89: 895-905.
- **Medrano, H.,** Bota, J., Cifre, J., Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Gulías, J. 2007. Eficiencia en el uso del agua por las plantas. *Investigaciones Geográficas*, 43: 63-84.
- **Mittelheuser, C.J.,** Van Steveninck, R.F.M. 1969. Stomatal closure and inhibition of transpiration induced by (RS)-abscisic acid. *Nature (London)*, 221: 281-282.
- **Mullis, K.,** Faloona, F., Scharf, S., Salki, R., Horn, G., Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51: 263-273.
- **Munns, R.** Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.
- **Nackley, L.,** Vogt, K., Kim, S. 2014. *Arundo donax* water use and photosynthetic responses to drought and elevated CO₂. *Agricultural Water Management*, 136: 13-22.
- **Naik, S.,** Goud, V., Rout, P., Dalai, A. 2010. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 578-597.
- **Nogués, S.,** Allen, D.J., Morrison, J.I.L., Baker, N.R. 1998. Ultraviolet-B radiation effects on waters relations, leaf development and photosynthesis in drought pea plants. *Plant Physiology*, 117: 173-745.
- **Nogués, S.,** Baker, N.R. 2000. Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *Journal of Experimental Botany*, 51: 1309 - 1317.
- **Nogués, S.,** Munné-Bosch, S., Casadesús, J., López-Carbonell, M., Alegre, L. 2001. Daily time course of whole-shoot gas-exchange rates in two drought-exposed Mediterranean shrubs. *Tree Physiology*, 21: 53-60.
- **Nogués, S.,** Alegre, L. 2002. An increase in water deficit has no impact on the photosynthetic capacity of field-grown Mediterranean plants. *Functional Plant Biology*, 29: 621-630.

- **Nogués, S.**, Tcherkez, G., Cornic, G., Ghashghaie, J. 2004. Respiratory carbon metabolism following illumination in intact French bean leaves using $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope labelling. *Plant Physiology* 136 (2): 3245-3254.
- **Nogués, S.**, Aljazairi, S., Arias, C., Sánchez, E., Aranjuelo, I. 2014. Two distinct plant respiratory phenotypes might exist which correspond to fast-growing and slow-growing species. *Journal of Plant Physiology*, 171, 1157-1163.
- **Parent, B.**, Hachez, C., Redondo, E., Simonneau, T., Chaumont, F., Tardieu, F. 2009. Drought and Abscisic Acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: A trans- Scale Approach. *Plant Physiology*, 179: 20002012.
- **Parrish, D.**, Fike, J. 2005. The biology and agronomy of switchgrass for biofuels. *Critical Reviews in Plant Science*, 24: 423-459.
- **Perdue, R.E.** 1958. *Arundo donax*: source of musical reeds and industrial cellulose. *Economic Botany* 12: 368-404.
- **Pilu, R.**, Bucci, A., Cerino Badone, F., Landoni, M. 2012. Giant Reed (*Arundo donax* L): a weed plant or a promising energy crop? *African Journal of Biotechnology*, 11: 9163-9174.
- **Pilu, R.**, Manca, A., Landoni, M. 2013. *Arundo donax* as an energy crop: pros and cons of the utilization of this perennial plant. *Maydica*, 58.
- **Pilu, R.**, Cassani, E., Landoni, M., Cerino Badone, F., Passera, A., Cantaluppi, E., Corno, L., Adani, F. 2014. Genetic characterization of an Italian Giant Reed (*Arundo donax* L.) clones collection: exploiting clonal selection. *Euphytica* 196: 169-181.
- **Pizzolongo, P.** 1962. Osservazioni cariologiche su *Arundo donax* e *Arundo plinii*, *Annals of Botany*. 27: 173-187.
- **Poorter, H.**, Niinemets, Ü., Poorter, L., Wright, I. J., Villar, R. (2009). Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytologist*, 182 (83): 565–588.
- **Ray, I.M.**, Townsend, M.S., Henning, J.A. 1998. Variation for yield, water use efficiency, and canopy morphology among nine alfalfa germplasms. *Crop Science* 38:1386–1390.
- **Richter, A.**, Wanek, W., Werner, R.A., Ghashghaie, J., Jäggi, M., Gessler, A., Brugnoli, E., Hettmann, E., Göttlicher, S.G., Salmon, Y., Bathellier, C., Kodama, N., Nogués, S., Sørensen, A., Volders, F., Sörgel, K., Blöchl, A., Siegwolf, R.T.W., Buchmann, N., Gleixner, G. 2009. Preparation of starch and soluble sugars of plant material for the analysis of carbon isotope composition: a comparison of methods. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23: 2476-2488.
- **Rosenzweig, C.**, Parry, M.L. 1994. Potential impact of climate change on world food supply. *Nature* 367: 133-138.
- **Rossa, B.**, Tüffers, A.V., Naidoo, G. Von Willert, D.J. 1998. *Arundo donax* L. (Poaceae) a C_3 species with unusually high photosynthetic capacity. *Plant Biology*, 111 (3): 216-221.

- **Sambrook, J.**, Russel, D. 2001. Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York.
- **Sánchez, E.**, 2015. Respuesta de gramíneas perennes frente al estrés para la producción de biomasa. Memoria para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona, 232 pp.
- **Sánchez, E.**, Gil, S., Azcón-Bieto, J., Nogués, S. 2016. The response of *Arundo donax* L. (C₃) and *Panicum virgatum* (C₄) to different stresses. Biomass and Bioenergy. 85: 335-345.
- **Sauras, T.Y.**, Vallejo, V.R., Valcke, E., Colle, C., Förstel, H., Millán, R., Jouglet, H. 1999. ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr root uptake prediction under close-to-real controlled conditions. Journal of Environmental Radioactivity, 45: 191-217.
- **Schievano, A.**, D'Imporzano, G., Corno, L., Adani, F., Cerino Badone, F., Pilu, R., 2012. Più biogas a costi inferiori con arundo o doppia coltura. Articolo pubblicato sul supplemento a l'Informatore Agrario 25: 21-25
- **Scordia, D.**, Cosentino, S., Lee, J.W., Jeffries, T.W. 2012. Bioconversion of giant reed (*Arundo donax* L) hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Scheffersomyces stipitis* CBS6054. Biomass Bioenergy 39: 296-305.
- **Scordia, D.**, Testa, G., Cosentino, S.L. 2014. Perennial grasses as lignocellulosic feedstock for second-generation bioethanol production in Mediterranean environment. Italian Journal of Agronomy, 9 (2): 84.
- **Sharkey, T.** 1990. Water stress effects on photosynthesis. Photosynthetica, 24: 651.
- **Slatyer, R.O.** 1967. Plant-water relationships. Academic Press, New York, 336 pp.
- **Slewinski, T.L.** 2012. Non-structural carbohydrate partitioning in grass stems: a target to increase yield stability, stress tolerance and biofuel production. Journal of Experimental Botany, 63, 4647-4670.
- **Stocker, T.F.**, Qin, D., Plattner, G.K., Alexander, L.V., Allen, S.K., Bindoff, N.L., Bréon, F.M., Church, J.A., Cubasch, U., Emori, S., Forster, P., Friedlingstein, P., Gillett, N., Gregory, J.M., Hartmann, D.L., Jansen, E., Kirtman, B., Knutti, R., Krishna Kumar, K., Lemke, P., Marotzke, J., Masson-Delmotte, V., Meehl, G.A., Mokhov, I.I., Piao, S., Ramaswamy, V., Randall, D., Rhein, M., Rojas, M., Sabine, C., Shindell, D., Talley, L.D., Vaughan D.G., Xie, S.P. 2013. Resumen técnico. En: Cambio climático 2013. Bases físicas. Contribución del Grupo de trabajo I al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Stocker, T.F., D. Qin, G.K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex y P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido y Nueva York, NY, Estados Unidos de América.
- **Stroup, S.**, Sanderson, M., Muir, J., McFarland, M., Reed, R. 2003. Comparison of growth and performance in upland and lowland switchgrass types to water and nitrogen stress. Bioresource Technology, 83: 65-72.

- **Tamura, K.**, Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–2739.
- **Taylor, G.R.** 1991. Polymerase chain reaction: basic principles and automation. En: PCR a practical approach. (McPherson, M.Y., Quirre, P., Taylor, G.R., eds). Oxford University Press, 1-14 pp.
- **Tcherkez, G.**, Nogués, S., Belton, J., Cornic, G., Adeline, MT., Deléens E. 2003. Metabolic origin of carbon isotope composition of leaf dark-respired CO₂ in French bean. *Plant Physiology*, 131 (1): 237-244.
- **Tcherkez, G.**, Hodges, M. 2008. How stable isotopes may help to elucidate primary nitrogen metabolism and its interactions with (photo) respiration in C₃ leaves. *Journal of Experimental Botany*, 59 (7): 1685-1693.
- **Tucker, G.C.** 1990. The genera of Arundinoideae (Graminae) in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum* 71: 145-177.
- **Verbruggen, A.**, Moomaw, W., Nyboer, J. 2011: Annex I: Glossary, Acronyms, Chemical Symbols and Prefixes. In IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation [O. Edenhofer, R. Pichs Madruga, Y. Sokona, K. Seyboth, P. Matschoss, S. Kadner, T. Zwickel, P. Eickemeier, G. Hansen, S. Schlömer, C. von Stechow (eds)], Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- **Vittoria, A.** 1958. Natura e neutralizzazione dell'avvelenamento colchicinico in Graminacee con riferimenti alle fitotossicosi, fisiologiche e patologiche, *Acta Medica Veterinaria* 4 (1): 1-108.
- **Von Caemmerer, S.**, Farquhar, G.F. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, 153 (4): 376-387.
- **Webster, R.J.**, Driever, S.M., Kromdijk, J., McGrath, J., Leakey, A.D., Siebke, K., Demetriades-Shah, T., Bonnage, S., Peloe, T., Lawson, T., Long, S.P. 2016. High C₃ photosynthetic capacity and high intrinsic water use efficiency underlies the high productivity of the bioenergy grass *Arundo donax*. *Scientific Reports*, 6, 20694.
- **Williams, T.**, Auer, C. 2014. Ploidy Number for *Panicum virgatum* (switchgrass) from the Long Island Sound Coastal Lowland compared to Upland and Lowland Cultivars. *Plant Science Articles*. Paper 27.
- **Xue, Y.**, Warburton, M.L., Sawkins, M., Zhang, X., Setter, T., Xu, Y., Grudloyma, P., Gethi, J., Ribaut, J.M., Li, W., Zhang, X., Zheng, Y., Yan, J. 2013. Genome-wide association analysis for nine agronomic traits in maize under well-watered and water-stressed conditions. *Theoretical and Applied Genetics*, 126 (10) 2587 – 2596.
- **Yan, J.**, Shah, T., Warburton, M.L., Buckler, E.S., McMullen, M.D., Crouch, J. 2009. Genetic characterization and linkage disequilibrium estimation of a global maize collection Using SNP Markers. *PLoS One* 4 (12).
- **Zhang, T.**, Yu, L.X., Zheng, P., Li, Y., Rivera, M., Main, D., Greene, S. 2015. Identification of Loci Associated with Drought Resistance Traits in

Heterozygous Autotetraploid Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Using Genome-Wide Association Studies with Genotyping by Sequencing. PLoS ONE, 10 (9).

- **Zidanšek, A.**, Blinc, R., Kabashi, S., Bekteshi, S., Šlaus, I. 2009. Climate changes, biofuels and the sustainable future. International Journal of Hydrogen Energy, 34(16): 6980-6983.

8. ANEXOS

8.1. Experimento I

Anexo 8.1. Medida de los parámetros de fluorescencia (F_v/F_m y F_v/F_m') en *A. donax* crecidas en condiciones de riego y seco en diferentes momentos (T_0 : primavera y T_1 : principio de verano). Los valores representan la media \pm SE de tres réplicas (n=3).

T_0					
R			S		
PAR_i	A	F_v/F_m'	PAR_i	A	F_v/F_m'
0	-0.98 \pm 0.29	0.65 \pm 0.00	0	-0.98 \pm 0.29	0.65 \pm 0.00
20	-0.42 \pm 0.13	0.62 \pm 0.01	20	-0.42 \pm 0.13	0.62 \pm 0.01
50	0.53 \pm 0.35	0.62 \pm 0.01	50	0.53 \pm 0.35	0.62 \pm 0.01
100	2.67 \pm 0.18	0.61 \pm 0.00	100	2.67 \pm 0.18	0.61 \pm 0.00
300	9.39 \pm 0.76	0.59 \pm 0.00	300	9.39 \pm 0.76	0.59 \pm 0.00
600	16.00 \pm 1.27	0.53 \pm 0.01	600	16.00 \pm 1.27	0.53 \pm 0.01
1200	20.33 \pm 1.63	0.41 \pm 0.01	1200	20.33 \pm 1.63	0.41 \pm 0.01
2000	23.53 \pm 1.20	0.34 \pm 0.01	2000	23.53 \pm 1.20	0.34 \pm 0.01
T_1					
R			S		
PAR_i	A	F_v/F_m'	PAR_i	A	F_v/F_m'
2	-0.59 \pm 0.36	0.70 \pm 0.00	2	-0.52 \pm 0.61	0.71 \pm 0.00
29	0.79 \pm 0.16	0.66 \pm 0.00	29	0.09 \pm 0.27	0.67 \pm 0.01
51	1.13 \pm 0.42	0.65 \pm 0.00	51	1.36 \pm 0.07	0.66 \pm 0.01
101	2.98 \pm 0.15	0.65 \pm 0.00	101	1.17 \pm 0.55	0.65 \pm 0.01
302	8.73 \pm 0.96	0.63 \pm 0.00	302	6.03 \pm 0.57	0.65 \pm 0.01
602	13.77 \pm 0.95	0.52 \pm 0.02	602	10.85 \pm 0.92	0.56 \pm 0.01
1201	16.43 \pm 1.11	0.41 \pm 0.01	1201	14.63 \pm 0.55	0.45 \pm 0.01
2000	17.57 \pm 1.42	0.38 \pm 0.01	2000	16.10 \pm 1.07	0.41 \pm 0.01

8.2. Experimento II

Anexo 8.2. Parámetros de intercambio de gases (A_{sat} , A_{max} , g_s , $V_{c,max}$ y J_{max}), fluorescencia modulada de las clorofilas (F_v/F_m y F_v/F_m') y eficiencia en el uso del agua ($EUA_{intrínseca}$) al inicio del experimento (Ti) en *A. donax*. Los datos muestran la media de tres réplicas ($n=3$) \pm SE.

A_{sat}	A_{max}	g_s	$V_{c,max}$	J_{max}	F_v/F_m	F_v/F_m'	EUA
22.93 \pm 2.37	33.73 \pm 2.31	0.27 \pm 0.03	139.94 \pm 20.99	227.23 \pm 14.22	0.797 \pm 0.012	0.457 \pm 0.009	84.93 \pm 0.64

Anexo 8.3. Contenido de clorofilas (SPAD) en plantas *A. donax* crecidas en tres tratamientos: Control (C, 100 % CM), sequía moderada (SM, 50 % CM) y sequía severa (SS, 25 % CM). Parámetro medido en dos momentos (Ti: inicial y Tf: final). Los valores representan la media \pm SE de cuatro réplicas ($n=4$). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ($P<0.05$) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.

Tratamiento	Tiempo	Media \pm SE
C	Ti	42.10 \pm 0.70 Aa
	Tf	42.06 \pm 1.01 Aa
SM	Ti	41.49 \pm 0.48 Aa
	Tf	42.71 \pm 1.03 Aa
SS	Ti	41.56 \pm 0.49 Aa
	Tf	41.95 \pm 0.88 Aa

Anexo 8.4. Análisis estadístico de los efectos de estrés hídrico de *A. donax*, en $\delta^{13}C_R$ (‰), $\delta^{13}C_{AST}$ (‰), $\delta^{13}C_{ALM}$ (‰) y $\delta^{13}C_{MOT}$ (‰).

	$\delta^{13}C_R$		$\delta^{13}C_{AST}$		$\delta^{13}C_{ALM}$		$\delta^{13}C_{MOT}$	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
Modelo	50.8	***	81.2	***	38.2	***	76.0	***
Tiempo	156.9	***	251.9	***	101.5	***	229.8	***
Tratamiento	3.7	**	22.1	***	5.9	***	14.9	***
Órgano	11.3	***	8.0	***	19.0	***	14.3	***
Tiempo*Tratamiento	37.7	***	30.8	***	28.4	***	29.1	***
Tiempo*Órgano	17.9	***	13.4	***	15.2	***	35.8	***
Tratamiento*Órgano	4.6	***	1.3	ns	1.5	ns	7.5	***
Tiempo*Tratamiento*Órgano	4.4	***	1.1	ns	1.2	ns	3.5	***

8.3. Experimento III

Anexo 8.5. Contenido de clorofilas (SPAD) en plantas *A. donax* crecidas en condiciones normales en invernadero. Parámetro medido al inicio y al final del experimento. Los valores representan la media \pm SE de cinco réplicas (n=5). Las letras mayúsculas indican diferencias significativas (P<0.05) entre tiempos para un mismo ecotipo y letras minúsculas diferencias (P<0.05) entre ecotipos dentro de un mismo momento de medición.

Ecotipo	Tiempo	Media \pm SE
Piccoplant	Inicial	42.16 \pm 0.12 Aa
	Final	42.10 \pm 0.22 Aa
Fondachello	Inicial	42.88 \pm 0.34 Aa
	Final	42.53 \pm 0.14 Aa
Martinensis	Inicial	42.30 \pm 0.66 Aa
	Final	42.18 \pm 0.57 Aa
Argentum	Inicial	41.98 \pm 0.47 Aa
	Final	41.85 \pm 0.13 Aa
Granadensis	Inicial	43.10 \pm 0.11 Aa
	Final	43.12 \pm 0.86 Aa

Anexo 8.6. Muestras de *A. donax* por ecotipo (P=Piccoplant; F=Fondachello; M=Martinensis; A=Argentum; G=Granadensis), concentración de ADN después de la electroforesis (Qubit), cantidad de agua para obtener una concentración final de 10 ng / μ l en un volumen final de 40 μ l, posición de cada muestra en la placa de Elisa.

Muestra	Qubit (ng/ul)	10ng/ul 40ul	ddH2O	Placa	Fila	Columna	Muestra	Qubit (ng/ul)	10ng/ul 40ul	ddH2O	Placa	Fila	Columna
P-1	75.40	5.31	34.7	plate1	A	1	M-7	26.40	15.15	24.8	plate1	F	7
P-2	59.80	6.69	33.3	plate1	A	2	M-8	21.60	18.52	21.5	plate1	F	8
P-3	32.40	12.35	27.7	plate1	A	3	M-9	20.80	19.23	20.8	plate1	F	9
P-4	57.00	7.02	33.0	plate1	A	4	M-10	26.00	15.38	24.6	plate1	F	10
P-5	28.40	14.08	25.9	plate1	A	5	M-11	37.20	10.75	29.2	plate1	F	11
P-6	37.60	10.64	29.4	plate1	A	6	M-12	26.20	15.27	24.7	plate1	F	12
P-7	70.80	5.65	34.4	plate1	A	7	M-13	30.00	13.33	26.7	plate1	G	1
P-8	38.40	10.42	29.6	plate1	A	8	M-14	24.20	16.53	23.5	plate1	G	2
P-9	96.80	4.13	35.9	plate1	A	9	M-15	74.60	5.36	34.6	plate1	G	3
P-10	34.60	11.56	28.4	plate1	A	10	M-16	45.60	8.77	31.2	plate1	G	4
P-11	38.80	10.31	29.7	plate1	A	11	M-17	36.20	11.05	29.0	plate1	G	5
P-12	76.00	5.26	34.7	plate1	A	12	M-18	45.60	8.77	31.2	plate1	G	6
P-13	32.20	12.42	27.6	plate1	B	1	M-19	41.20	9.71	30.3	plate1	G	7
P-14	48.80	8.20	31.8	plate1	B	2	M-20	33.40	11.98	28.0	plate1	G	8
P-15	67.60	5.92	34.1	plate1	B	3	M-21	26.40	15.15	24.8	plate1	G	9
P-16	39.52	10.12	29.9	plate1	B	4	M-22	25.60	15.63	24.4	plate1	G	10
P-17	40.88	9.79	30.2	plate1	B	5	M-23	45.40	8.81	31.2	plate1	G	11
P-18	88.00	4.55	35.5	plate1	B	6	M-24	49.40	8.10	31.9	plate1	G	12
P-19	62.20	6.43	33.6	plate1	B	7	M-25	60.80	6.58	33.4	plate1	H	1
P-20	82.80	4.83	35.2	plate1	B	8	M-26	23.40	17.09	22.9	plate1	H	2

P-21	59.60	6.71	33.3	plate1	B	9	M-27	31.60	12.66	27.3	plate1	H	3
P-22	59.20	6.76	33.2	plate1	B	10	M-28	23.20	17.24	22.8	plate1	H	4
P-23	64.20	6.23	33.8	plate1	B	11	M-29	49.60	8.06	31.9	plate1	H	5
P-24	84.20	4.75	35.2	plate1	B	12	M-30	40.20	9.95	30.0	plate1	H	6
P-25	66.20	6.04	34.0	plate1	C	1	M-31	47.00	8.51	31.5	plate1	H	7
P-26	39.80	10.05	29.9	plate1	C	2	M-32	45.60	8.77	31.2	plate1	H	8
P-27	44.00	9.09	30.9	plate1	C	3	M-33	54.80	7.30	32.7	plate1	H	9
F-1	41.00	9.76	30.2	plate1	C	4	M-34	52.00	7.69	32.3	plate1	H	10
F-2	64.80	6.17	33.8	plate1	C	5	M-35	43.60	9.17	30.8	plate1	H	11
F-3	34.80	11.49	28.5	plate1	C	6	M-36	47.57	8.41	31.6	plate1	H	12
F-4	53.00	7.55	32.5	plate1	C	7	M-37	28.80	13.89	26.1	plate2	A	1
F-5	54.40	7.35	32.6	plate1	C	8	M-38	28.20	14.18	25.8	plate2	A	2
F-6	39.20	10.20	29.8	plate1	C	9	M-39	28.80	13.89	26.1	plate2	A	3
F-7	42.60	9.39	30.6	plate1	C	10	M-40	47.60	8.40	31.6	plate2	A	4
F-8	44.20	9.05	31.0	plate1	C	11	M-41	34.00	11.76	28.2	plate2	A	5
F-9	50.20	7.97	32.0	plate1	C	12	M-42	45.40	8.81	31.2	plate2	A	6
F-10	89.60	4.46	35.5	plate1	D	1	M-43	51.00	7.84	32.2	plate2	A	7
F-11	48.20	8.30	31.7	plate1	D	2	M-44	68.80	5.81	34.2	plate2	A	8
F-12	100.00	4.00	36.0	plate1	D	3	M-45	31.20	12.82	27.2	plate2	A	9
F-13	62.20	6.43	33.6	plate1	D	4	M-46	45.12	8.87	31.1	plate2	A	10
F-14	24.20	16.53	23.5	plate1	D	5	M-47	25.60	15.63	24.4	plate2	A	11
F-15	43.00	9.30	30.7	plate1	D	6	M-48	28.40	14.08	25.9	plate2	A	12
F-16	96.40	4.15	35.9	plate1	D	7	M-49	21.80	18.35	21.7	plate2	B	1
F-17	56.80	7.04	33.0	plate1	D	8	M-50	23.40	17.09	22.9	plate2	B	2
F-18	30.40	13.16	26.8	plate1	D	9	M-51	48.60	8.23	31.8	plate2	B	3
F-19	70.00	5.71	34.3	plate1	D	10	M-52	29.80	13.42	26.6	plate2	B	4
F-20	31.60	12.66	27.3	plate1	D	11	A1	38.20	10.47	29.5	plate2	B	5
F-21	61.00	6.56	33.4	plate1	D	12	A2	38.40	10.42	29.6	plate2	B	6
F-22	60.00	6.67	33.3	plate1	E	1	A3	30.60	13.07	26.9	plate2	B	7
F-23	66.60	6.01	34.0	plate1	E	2	A4	39.00	10.26	29.7	plate2	B	8
F-24	46.60	8.58	31.4	plate1	E	3	A5	43.76	9.14	30.9	plate2	B	9
G-1	42.60	9.39	30.6	plate1	E	4	A6	15.70	25.48	14.5	plate2	B	10
G-2	60.40	6.62	33.4	plate1	E	5	A7	31.80	12.58	27.4	plate2	B	11
G-3	78.40	5.10	34.9	plate1	E	6	A8	27.80	14.39	25.6	plate2	B	12
G-4	41.00	9.76	30.2	plate1	E	7	A9	33.60	11.90	28.1	plate2	C	1
G-5	52.00	7.69	32.3	plate1	E	8	A10	45.80	8.73	31.3	plate2	C	2
G-6	98.80	4.05	36.0	plate1	E	9	A11	37.80	10.58	29.4	plate2	C	3
G-7	88.20	4.54	35.5	plate1	E	10	A12	55.40	7.22	32.8	plate2	C	4
G-8	24.60	16.26	23.7	plate1	E	11	A13	51.60	7.75	32.2	plate2	C	5
G-9	52.20	7.66	32.3	plate1	E	12	A14	37.90	10.55	29.4	plate2	C	6
M-1	38.00	10.53	29.5	plate1	F	1	A15	52.17	7.67	32.3	plate2	C	7
M-2	45.00	8.89	31.1	plate1	F	2	A16	60.82	6.58	33.4	plate2	C	8
M-3	132.80	3.01	37.0	plate1	F	3	A17	18.50	21.62	18.4	plate2	C	9
M-4	43.20	9.26	30.7	plate1	F	4	A18	32.00	12.50	27.5	plate2	C	10
M-5	25.00	16.00	24.0	plate1	F	5	A19	38.80	10.31	29.7	plate2	C	11
M-6	22.60	17.70	22.3	plate1	F	6							

Anexo 8.7. Placas de Elisa con el orden en que se colocaron los códigos de barra para las 131 muestras del Experimento III. BC = Código de barras.

Placa 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BC1	BC2	BC3	BC4	BC5	BC6	BC7	BC8	BC9	BC10	BC11	BC12
B	BC13	BC14	BC15	BC16	BC17	BC18	BC19	BC20	BC21	BC22	BC23	BC24
C	BC25	BC26	BC27	BC28	BC29	BC30	BC31	BC32	BC33	BC1	BC2	BC3
D	BC4	BC5	BC6	BC7	BC8	BC9	BC10	BC11	BC12	BC13	BC14	BC15
E	BC16	BC17	BC18	BC19	BC20	BC21	BC22	BC23	BC24	BC25	BC26	BC27
F	BC28	BC29	BC30	BC31	BC32	BC33	BC1	BC2	BC3	BC4	BC5	BC6
G	BC7	BC8	BC9	BC10	BC11	BC12	BC13	BC14	BC15	BC16	BC17	BC18
H	BC19	BC20	BC21	BC22	BC23	BC24	BC25	BC26	BC27	BC28	BC29	BC30

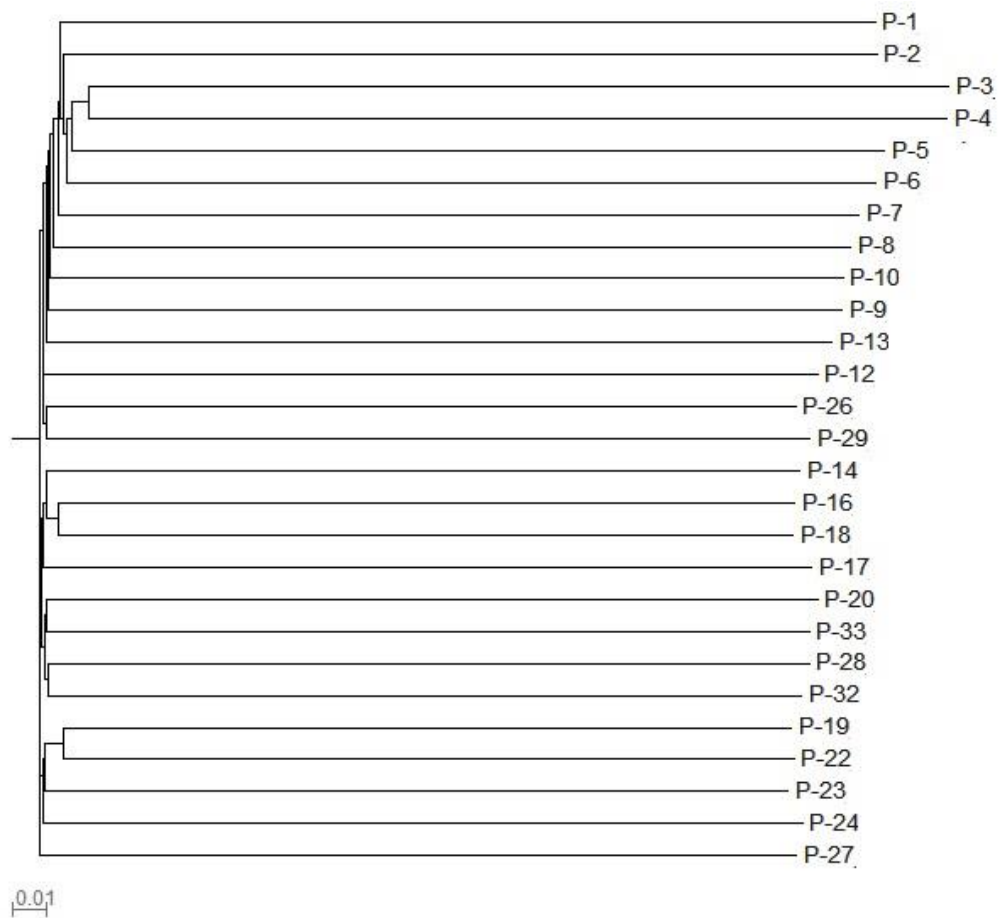
Placa 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BC31	BC32	BC33	BC1	BC2	BC3	BC4	BC5	BC6	BC7	BC8	BC9
B	BC10	BC11	BC12	BC13	BC14	BC15	BC16	BC17	BC18	BC19	BC20	BC21
C	BC22	BC23	BC24	BC25	BC26	BC27	BC28	BC29	BC30	BC31	BC32	
D												
E												
F												
G												
H												

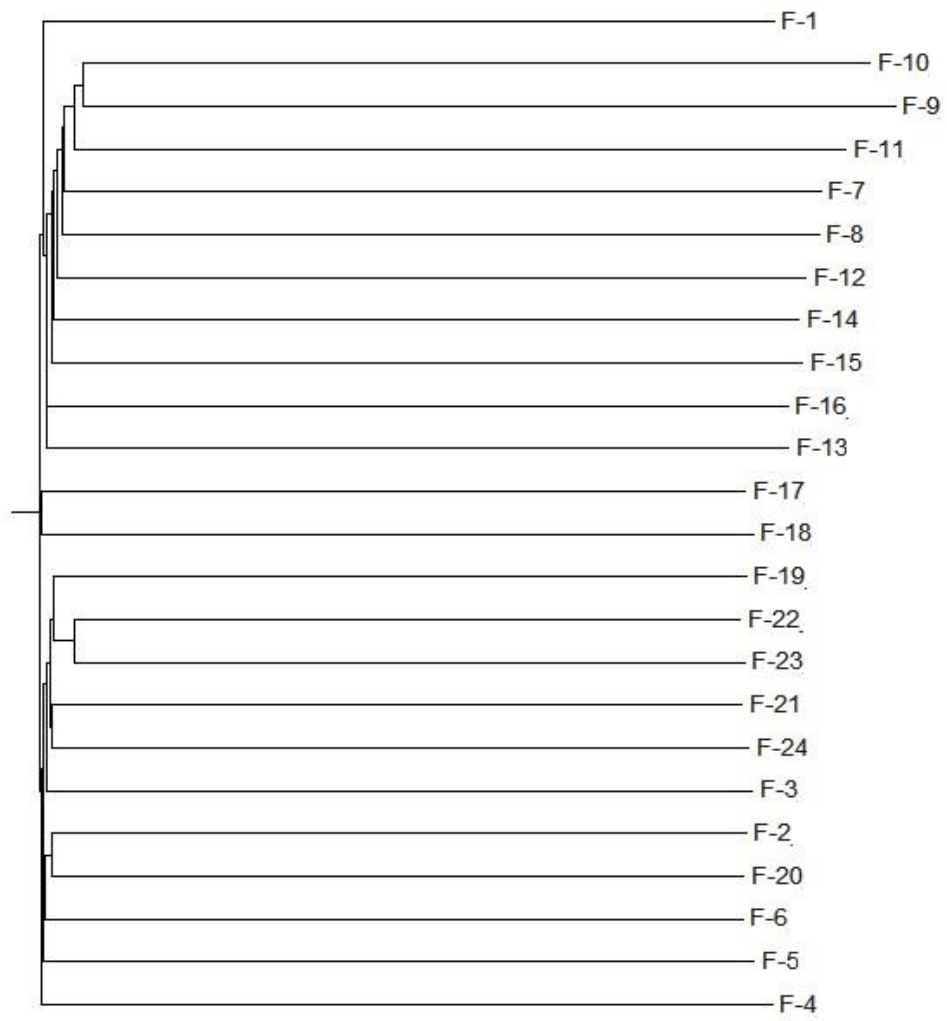
Anexo 8.8. Concentración de ADNg obtenido con el Qubit® 2.0 Fluorometer.

Tubo	Concentración ADNg (ng/μl)
1	4.10
2	3.66
3	3.70
4	3.46

Anexo 8.9. Árbol filogenético del ecotipo Piccoplant.

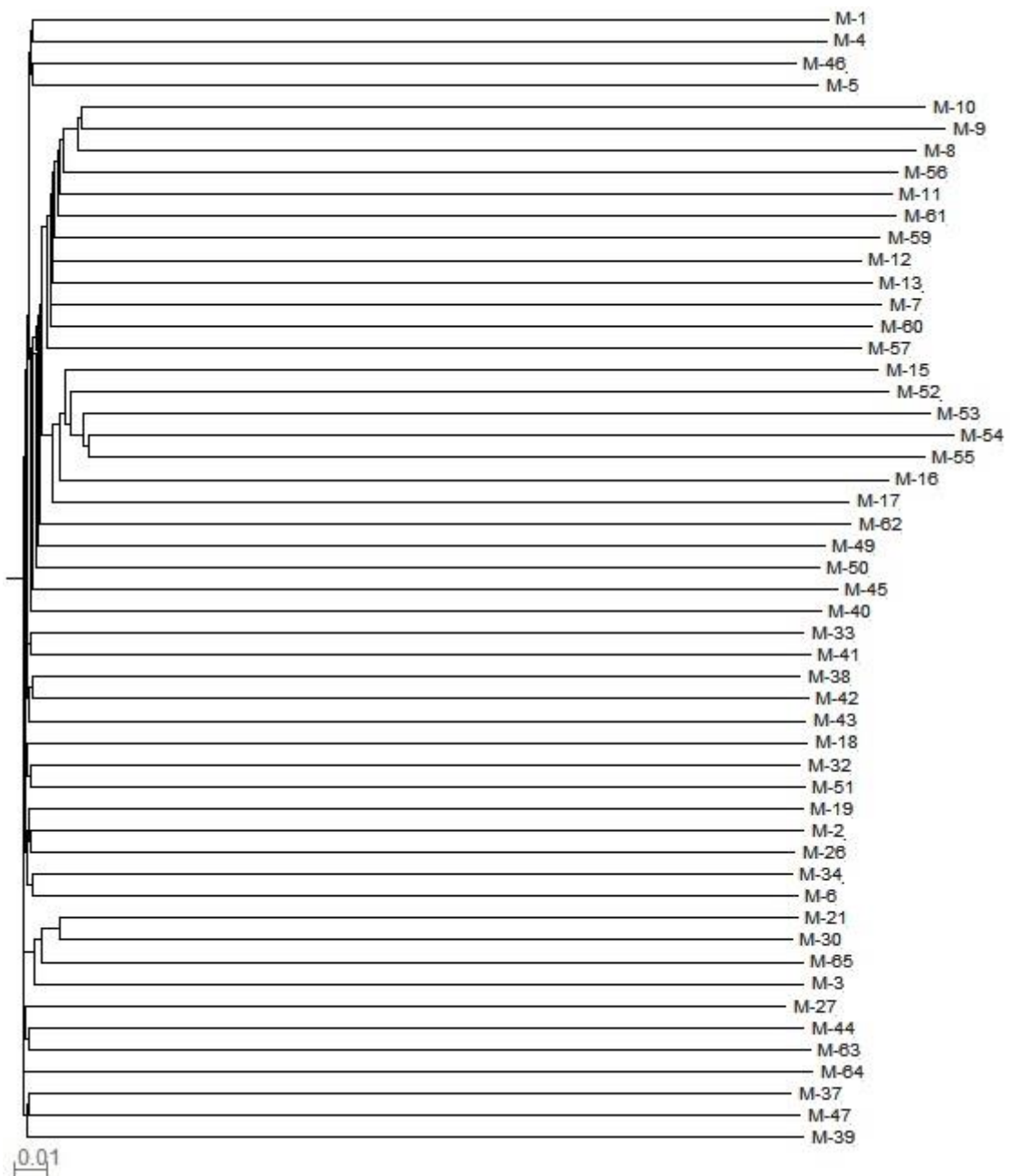


Anexo 8.10. Árbol filogenético del ecotipo Fondachello.

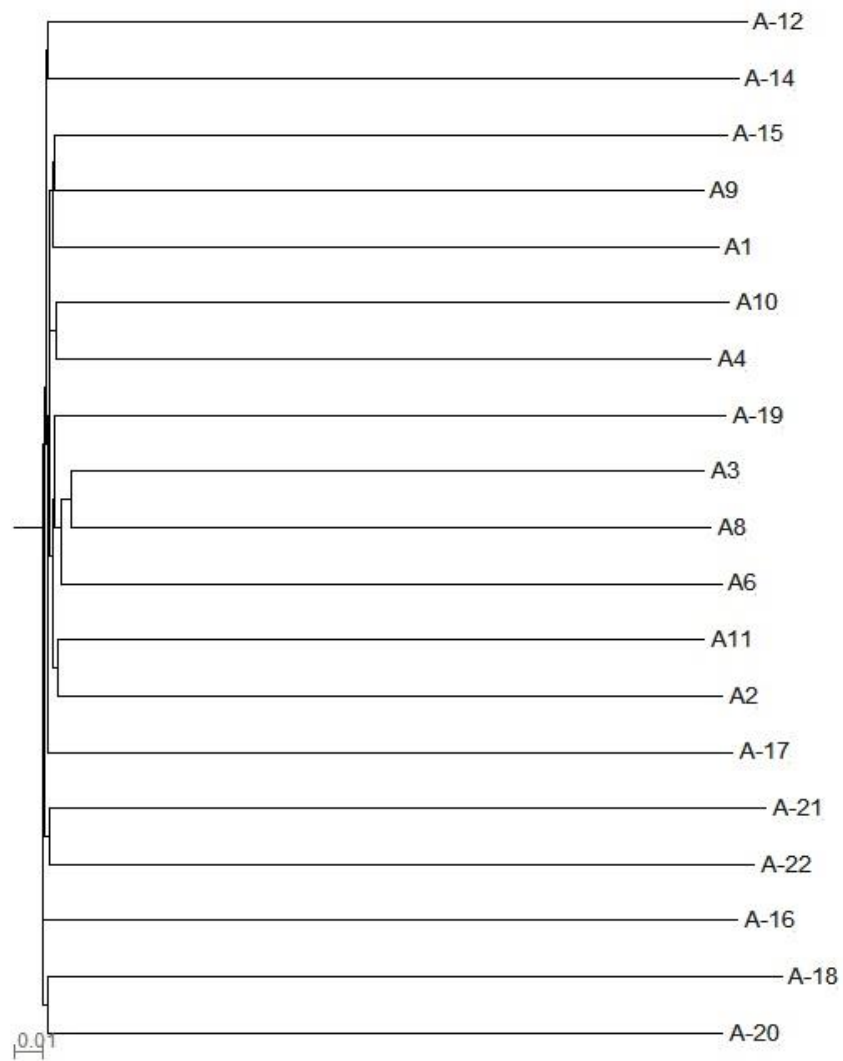


0.01

Anexo 8.11. Árbol filogenético del ecotipo Martinensis.



Anexo 8.12. Árbol filogenético del ecotipo Argetum.



Anexo 8.13. Árbol filogenético del ecotipo Granadensis.

