



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE BIOLOGIA

Departamento de Fisiología Vegetal



Mecanismos de aclimatación de la asimilación fotosintética de carbono a los aumentos de CO₂ y temperatura del aire en el trigo

Tesis Doctoral

Aitor Alonso Nieto



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE BIOLOGIA

Departamento de Fisiología Vegetal

Mecanismos de aclimatación de la asimilación fotosintética de carbono a los aumentos de CO₂ y temperatura del aire en el trigo

Memoria Presentada por D. Aitor
Alonso Nieto para aspirar al grado de
Doctor por la Universidad de
Salamanca.

Salamanca, 9 de Mayo de 2008

El presente trabajo titulado “Mecanismos de aclimatación de la asimilación fotosintética de carbono a los aumentos de CO₂ y temperatura del aire en el trigo” ha sido realizado bajo mi dirección en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA) adscrito al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y estimo que puede ser presentado ante el tribunal que lo ha de juzgar.

Salamanca, 11 de Febrero de 2008

Dr. Rafael Martínez-Carrasco Tabuena

Vº Bº, la Tutora

Dra. Emilia Labrador Encinas

Itaca (K. Kavafis)

Cuando emprendas tu viaje a Itaca
pide que el camino sea largo,
lleno de aventuras, lleno de experiencias.
No temas a los lestrigones ni a los cíclopes
ni al colérico Poseidón,
seres tales jamás hallarás en tu camino,
si tu pensar es elevado, si selecta
es la emoción que toca tu espíritu y tu cuerpo.
Ni a los lestrigones ni a los cíclopes
ni al salvaje Poseidón encontrarás,
si no los llevas dentro de tu alma,
si no los yergue tu alma ante ti.

Pide que el camino sea largo.
Que muchas sean las mañanas de verano
en que llegues -¡con qué placer y alegría!-
a puertos nunca vistos antes.
Detente en los emporios de Fenicia
y hazte con hermosas mercancías,
nácar y coral, ámbar y ébano
y toda suerte de perfumes sensuales,
cuantos más abundantes perfumes sensuales puedas.
Ve a muchas ciudades egipcias
a aprender, a aprender de sus sabios.

Ten siempre a Itaca en tu mente.
Llegar allí es tu destino.
Mas no apresures nunca el viaje.
Mejor que dure muchos años
y atracar, viejo ya, en la isla,
enriquecido de cuanto ganaste en el camino
sin aguantar a que Itaca te enriquezca.

Itaca te brindó tan hermoso viaje.
Sin ella no habrías emprendido el camino.
Pero no tiene ya nada que darte.

Aunque la halles pobre, Itaca no te ha engañado.
Así, sabio como te has vuelto, con tanta experiencia,
entenderás ya qué significan las Itacas.

Extraído de C. P. Cavafis. Antología poética.
Alianza Editorial, Madrid 1999.

Agradecimientos

Recordar estos seis años, me pone un poco melancólico, por lo bueno que he vivido y por que es el fin de una etapa. Pero también me hace feliz recordar y de algún modo agradecer o hacer constar a toda esa gente que me ha ayudado, apoyado o simplemente hecho compañía durante este tiempo. Llegué a Salamanca como un muchachillo asustado y se puede decir que “de la mano de mis padres” y a pesar de que sigo siendo ese chico asustado, después de este tiempo he ido cargando mi mochila, compañera de viajes a casa los fines de semana, de un montón de experiencias, amistades, e historias que recordar. Como dice el poema de Kavafis que he elegido para acompañar esta Tesis “Itaca te brindó tan hermoso viaje [...] Así, sabio como te has vuelto, con tantas experiencias, entenderás ya qué significan las Itacas”.

En primer lugar me gustaría dar las gracias al Dr. Rafael Martínez-Carrasco Tabuena, director de esta Tesis. Sin tu ayuda, nunca habría podido acabarla. Gracias por tu buena dirección, por tus consejos, experiencia y ayuda. Confiaste en mi para hacer esto y a pesar de que sé que en algunas ocasiones no he estado a la altura espero que te lles un buen recuerdo de este vasco “un poco vagoete”.

A la Dra. Emilia Labrador, Directora del Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad de Salamanca por darme la posibilidad, siendo tutora de este trabajo, de presentar esta tesis a través de dicho departamento.

A las doctoras Pilar Pérez, Rosa Maria Morcuende y Svetla Kostadinova por su ayuda, consejos y su compañerismo. Por esos cafés de mañana, esas charlas a las cuatro para no quedarnos dormidos, ese trabajo en el campo. También a la Dra. Isabel Martín del Molino y al Dr. Luís Sánchez de la Puente por acogerme tan bien cuando llegué.

A Ángel Luís Verdejo Centeno, por enseñármelo todo en el laboratorio y por hacerme tan divertidas las jornadas de campo, ha sido mi maestro y mi compadre; echaré de menos las discusiones políticas de cada mañana (cómo nos gusta picarnos) y nuestra canción de Manolo y Benito (larirarararara...).

A Gloria Zita Padilla, profesora de la UNAM y becaria cuando yo llegué, gracias por acogerme tan estupendamente (eras mi madre salmantina, jejeje) y ayudarme a pasar los primeros tragos de la vida solo y de comenzar una tesis.

A Elena Gutiérrez, mi segunda compañera becaria (ya te queda poco también a ti). Has sido la mejor compañera que nunca pude desear y a pesar de los piques y las peleas, yo me quedo con los buenos ratos. A Diego Gutiérrez, llegaste con mucha

energía y nos inundaste el labo de plantas. Aparte de nuestras charlas sobre esoterismo y tías (no necesariamente sobre los dos temas a la vez) me quedo con la buena amistad y el buen rollo. Ánimo, sé que lo conseguirás tú también.

A las doctoras Jacinta García-Talegón y Beatriz Rodríguez Vázquez de Aldana. Por ser, además de compañeras de centro, amigas. Por ayudarme tanto, darme apoyo y buenísimos consejos. Ha sido una suerte teneros como amigas. No me quiero olvidar también de la Dra. Carmen del Hoyo, que aunque llegó más tarde, ha sido también una muy sabia consejera y amiga.

Al Dr. Iker Aranjuelo (Sr. Aranjuelo) y al Dr. Gorka Erice, por esos veranos de Salamanca a Muñovela y viceversa en el panda y el 4L y por, llevando solo unos meses en la ciudad, enseñarme los buenos bares de pinchos. Seguiremos nuestra comunicación a través del blog.

A todos los Becari@s (y añadidos) del IRNASA. Y pensar que al principio casi ni nos hablamos y desde aquellos carnavales “presidiáricos”, hicimos piña y empezamos a salir un montón. Gracias a las supernenas (María Plantas, Salud y Cristina), me encantó ser vuestro mojo-yoyo (jejeje). A Lorena, aunque hemos coincidido poco hicimos buenas migas. A Noemí -qué bueno ha sido conocerte y qué pena no haberlo hecho antes- me has ayudado y enseñado (aparte de un montón de buenos grupos de música) más de lo que piensas y lo sigues haciendo. A Sergio Salazar, hemos llevado nuestras tesis (se que me permites decir esto) igual de mal, pero empezamos a la vez y acabamos a la vez y me alegro de haber coincidido en esto con un tío tan bueno y noble como tú. Además, qué bien nos lo hemos pasado LaNoe (jua, jua, jua), tú y yo últimamente. A Oni, el italiano que vino una temporada y ya no se quiso ir. Ánimo y suerte con la tesis que estás empezando. A María Piedras y Marta por esos ratos en vuestro cubículo, qué risas nos echamos y qué broncas de Jacin, je, je. También al resto de becarios de las piedras, Nando, Carmencita, Sara, Sole y mi querida Rebeca (ánimo...). A Silvia y Sara, que sois unas campeonas y habéis acabado antes que yo. A Yoli, que ha sido gran amiga también fuera del IRNASA, aun me acuerdo de cuando probabas tus inventos culinarios conmigo. Gracias por dejar que te volviera loca con mis problemas y por tener siempre paciencia y buenos detalles conmigo.

A la gente de prácticas que estuvo con nosotros y nos ayudó tanto, recordando más o menos: Ana, Margarita, Susana, Virginia... y sobre todo Victoria, que como ya hemos hablado muchas veces espero que siempre estemos en contacto de alguna forma.

Al resto de la gente del IRNASA, y entre ellos a los “majetes” Juan Carlos y Álvaro, qué risas (alguna escandalosa) y qué buenos ratos en el IRNASA y fuera de él. También a Pilar Cartes por facilitarme tanto la maldita burocracia y por contarme historias históricas del IRNASA y de Salamanca.

A mis compis de los cursos de doctorado, Noemí, Paloma, Estela, Paola, Carlos, Ruth, Germán, etc... por lo bien que lo pasamos, a algunos os he perdido la pista y a otros se que os va muy bien, incluso triunfando en el extranjero.

A mis amigos de Salamanca, María, Lourdes, Mabel, Miriam, Lili y David (Peri) por acogerme como a uno más cuando llegué, convertirme en vuestra familia y hacerme la vida más fácil en una ciudad nueva. A Saray, porque has sido muy importante para mí y porque formas indefectiblemente parte de mi historia personal. A Raúl y Víctor, por ser lo que se llama unos amigos de verdad, nos queda aún mucho que compartir. Echaré de menos también, las tardes de pinchos y las noches y madrugadas por los bares salmantinos (cómo las hemos montado los tres solteros de oro...).

Por último a mi familia, a la que debo todo en la vida y sobre todo a mi hermano (mi tato), a mi madre que me ha enseñado todo lo que sé y a mi padre, ejemplo de coraje y superación ante la adversidad.

Gracias a todos los que me habéis ayudado de una forma u otra (los que están y de los que me he olvidado) porque sin vosotros no podría haber echo esto.

A mis padres

*Living is easy with eyes closed
Misunderstanding all you see
It's getting hard to be someone
But it all works out
It doesn't matter much to me*

Strawberry field forever (The Beatles)

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.1. La atmósfera y el clima de la tierra	3
1.2. El CO ₂ y las plantas	7
1.3. Asimilación fotosintética de CO ₂	8
1.3.1. Transporte de electrones. Síntesis de ATP y generación de poder reductor (NADPH)	9
1.3.2. Ciclo de Benson-Calvin o ciclo reductor del carbono fotosintético	10
1.3.3. Regulación del Ciclo Fotosintético de Reducción de Carbono	11
1.4. Enzima Rubisco	13
1.4.1. Regulación de la actividad Rubisco. Rubisco Activasa	15
1.5. Un modelo para la fijación fotosintética de CO ₂	17
1.5.1. Formulación matemática del modelo	19
1.5.2. Dependencia de la temperatura de los parámetros de la fotosíntesis	24
1.6. Efectos del Cambio Climático sobre las plantas	24
1.6.1. Efecto del CO ₂ elevado sobre la fotosíntesis	25
1.6.2. Efecto del aumento de temperatura sobre la fotosíntesis	27
1.6.3. Efecto interactivo del aumento del CO ₂ y la Temperatura	29
OBJETIVOS	31
MATERIALES Y METODOS	35
3.1. Material Vegetal	37
3.1.1. Especie vegetal utilizada: <i>Triticum aestivum</i> L.	37
3.1.2. Variedades de <i>Triticum aestivum</i> L. utilizadas	38
3.2. Condiciones de cultivo y diseños experimentales	39
3.2.1. Experimento de campo	39
3.2.1.1. Cámaras de gradiente de temperatura (CGT)	40
3.2.2. Experimento en cámara de crecimiento	43
3.2.3. Diseños experimentales	45

3.3. Determinaciones experimentales	46
3.3.1. Toma de muestras y conservación	46
3.3.2. Medida de la fotosíntesis	46
3.3.2.1. Curvas de respuesta a la temperatura	49
3.3.2.2. Respuesta inicial al CO₂ en dos intensidades de luz	50
3.3.2.3. Curvas de respuesta al CO₂ (curvas A/C_i)	50
3.3.2.4. Curva de respuesta a la luz	53
3.3.3. Análisis de actividad Rubisco a diferentes temperaturas	53
3.3.4. Medida de la aclimatación de los estomas y la fotosíntesis	57
3.4. Tratamiento estadístico	58
RESULTADOS	61
<hr/>	
4.1. Aclimatación de los estomas y la fotosíntesis al CO₂	
y la temperatura elevados	63
4.1.1. Condiciones ambientales en las cámaras de gradiente	
de temperatura	65
4.1.2. Conductancia de los estomas	66
4.1.3. Fotosíntesis	71
4.1.4. Razón C_i/C_a y limitación estomática	73
4.1.5. Concentración de clorofila	76
4.2. Efectos del CO₂ y la temperatura elevados en la respuesta	
de la fotosíntesis a la temperatura	79
4.2.1. Intercambio gaseoso	81
4.2.2. Influencia de la conductancia (g_s)	88
4.2.3. Relaciones A-C_i	90
4.2.4. Velocidad máxima de carboxilación	92
4.3. Respuesta a la temperatura de los parámetros de un	
modelo de la fotosíntesis en plantas crecidas en CO ₂ ambiente y elevado	99
4.3.1. Punto de compensación para el CO₂ y respiración	101
4.3.2. Velocidades máximas de carboxilación, transporte	
de electrones y fotosíntesis	103
4.3.3. Respuestas de los parámetros de la fotosíntesis a la	
temperatura	105

4.3.4. Curvas de respuesta A/C_c	108
4.3.5. Curvas de respuesta a la temperatura	110
<u>DISCUSIÓN</u>	113
5.1. Aclimatación de los estomas y la fotosíntesis al CO_2 y la temperatura elevados	115
5.2. Efectos del CO_2 y la temperatura elevados en la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura	119
5.3. Respuesta a la temperatura de los parámetros de un modelo de la fotosíntesis en plantas crecidas en CO_2 ambiente y elevado	123
<u>CONCLUSIONES</u>	127
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	131



INTRODUCCION

1.1. La atmósfera y el clima de la tierra

Que la atmósfera tiene un papel clave en la existencia de la vida en la Tierra está claro, sin ella no existiría la vida tal y como la conocemos actualmente. Pero es importante indicar que su composición ha sido variable a lo largo de la historia del planeta y ha provocado una importante presión selectiva sobre los seres vivos, que han tenido que adaptarse a esos cambios o de alguna manera intentar mitigarlos.

Las plantas, por ejemplo, han desarrollado la capacidad de sobrevivir a estas cambiantes condiciones atmosféricas alterando, en algunos casos, la propia composición de la atmósfera, y en otros casos llegando a transformar su propia fisiología para adaptarse a los diferentes tipos de estreses a los que fueron sometidas. Sin embargo, el hombre ha optado por transformar su entorno para adaptarlo a su modo de vida y a su propia comodidad. Alterando sin darse cuenta, o siendo consciente de ello pero sin darle la importancia debida, el medio que le rodeaba, alterando ecosistemas y rompiendo el equilibrio ecológico del planeta.

Se puede definir el clima como el valor medio de los distintos componentes climáticos (temperatura, humedad, precipitación, etc.) en un lugar o región. Es decir, el clima es el promedio de las variables climáticas para un periodo de tiempo definido (años, siglos, milenios, etc.).

La composición de la atmósfera tiene un papel importante en la determinación del clima, al igual que las corrientes oceánicas, los casquetes polares, la orografía y geología del planeta, etc. En ausencia de cualquier atmósfera, la temperatura superficial de la tierra sería de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, conocida como *temperatura efectiva de radiación terrestre*. Sin embargo, la temperatura media de la superficie terrestre es de $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, ya que la temperatura de la tierra es fruto del equilibrio mantenido entre la radiación solar que llega a la tierra y la radiación que es reflejada por la superficie terrestre, con el papel intermediario de la atmósfera. Así, parte de la radiación de onda corta que procede del sol es reflejada por las nubes y gases que componen la atmósfera, otra parte es retenida por ella y el resto, un 45%, atraviesa la atmósfera sin ser absorbida y llega a la superficie del planeta (Larcher 2003). La superficie terrestre reirradia la radiación de onda corta en forma de radiación infrarroja (onda larga) que será en parte retenida por los gases de efecto invernadero presentes en la atmósfera causando el calentamiento del

planeta. Este fenómeno se conoce como “Efecto Invernadero” y como se ha explicado es imprescindible para mantener la temperatura y con ello la vida en el planeta.

Al haber transformado su entorno, el hombre también ha modificado la composición de la atmósfera provocando la principal consecuencia del cambio climático, una “Estimulación del Efecto Invernadero” provocada al aumentar la emisión de gases de efecto invernadero. De entre estos gases destaca el CO₂ por su importancia como gas invernadero y por ser el emitido en mayor cantidad (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Gases más comunes de Efecto Invernadero. Sus fuentes de origen y su contribución al calentamiento de la atmósfera.

Gas	Origen	Contribución al calentamiento (%)
Dióxido de Carbono (CO₂)	-Quema de combustibles fósiles (77%) -Deforestación (23%)	55
Clorofluorocarbonados (CFC) y gases afines (HFC y CFC)	-Diversos usos industriales: refrigeradoras, aerosoles de espuma, solventes. -Agricultura intensiva.	24
Metano (CH₄)	-Minería del carbón. -Fugas de gas. -Deforestación. -Respiración de plantas y suelos por efectos del calentamiento global. -Fermentación entérica.	15
Óxidos de nitrógeno (NO_x)	-Agricultura y silvicultura intensivas. -Quema de biomasa. -Uso de fertilizantes. -Quema de combustibles fósiles.	6

La concentración de CO₂ de la atmósfera no ha sido constante a lo largo de la historia de la Tierra (Fig 1.1). Ha habido periodos donde la concentración de este gas era mayor a la actual, superaba los 5000 μmol de CO₂ mol⁻¹ y otros en los que la concentración de CO₂ era menor a la actual. De hecho, la concentración de este gas ha tenido importantes fluctuaciones históricas, observándose una fuerte disminución de su concentración desde que se establecieron las primeras plantas vasculares, tras lo cual no se han observado concentraciones mayores de 2000 μmol de CO₂ mol⁻¹, ya que se ha mantenido la concentración de CO₂ dentro de ciertos niveles a través de la

removilización de la fotosíntesis y de los procesos geológicos y biológicos. Esta variabilidad encontrada cuando estudiamos la concentración de CO_2 atmosférica desde el punto de vista geológico o de la historia del planeta, ha hecho que ciertos grupos pongan en duda si realmente este incremento que se produce actualmente no pueda revertirse en los próximos años manteniendo ritmos cíclicos.

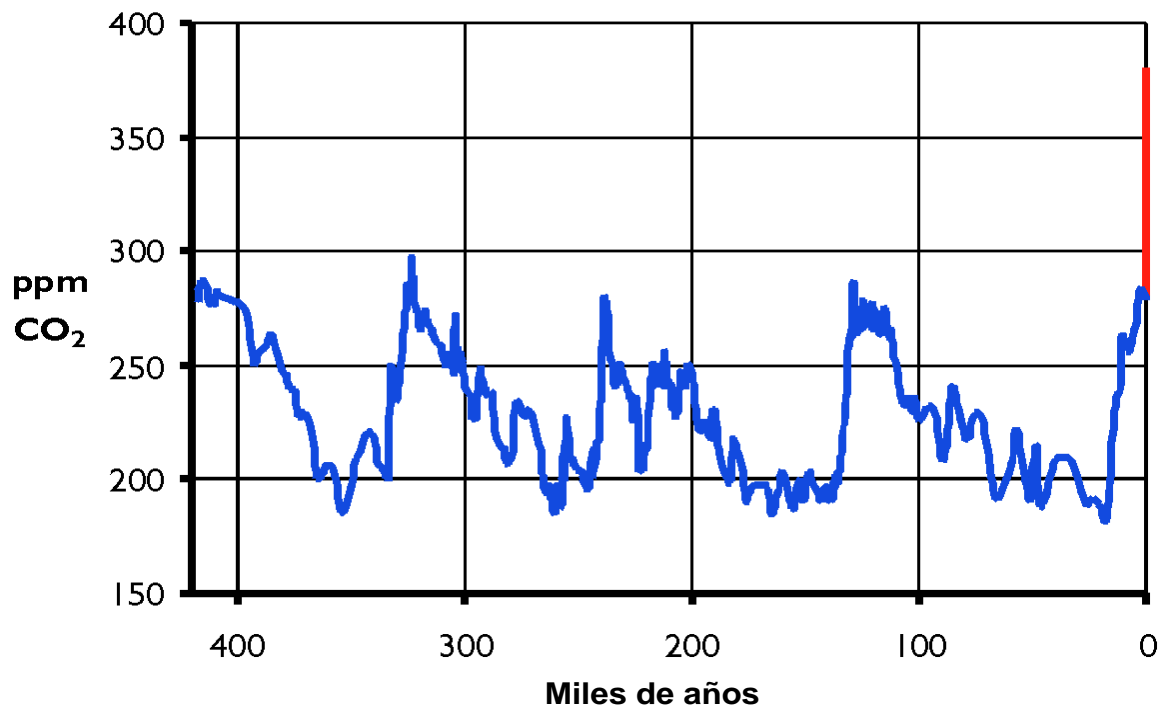


Fig.1.1. Concentración de dióxido de carbono en los últimos 417.000 años. La parte roja indica la variación a partir de 1800. (<http://cdiac.esd.ornl.gov/trends/co2/vostok.html>)

Tener medidas precisas y fiables de la concentración atmosférica de CO_2 ha nivel histórico no ha sido fácil, ya que las medidas mas detalladas datan de hace pocas décadas. Las mas conocidas, con datos desde 1955, son las del volcán Manua Loa (Hawai) descritas por Keeling (1986), donde destacan fuertes variaciones estacionales de alrededor de $10 \mu\text{mol de CO}_2 \text{ mol}^{-1}$. Para obtener medidas de la concentración atmosférica de CO_2 en el pasado, se utilizan técnicas indirectas, de entre las que destacan los indicadores físicos, químicos y biológicos, como por ejemplo los anillos de los troncos de los árboles con cientos y miles de años, los sedimentos de los fondos oceánicos y lagos, las bandas de densidad de los corales de larga vida, etc. Aunque uno de los indicadores más estudiado son las pequeñas burbujas de aire antiguo que han quedado atrapadas en las capas de hielo polares (Lago Vostok, Antártida) y en los glaciares permanentes. Estos núcleos de hielo nos pueden ayudar a conocer la

temperatura y la concentración de gases, como el CO₂, desde hace casi 500 mil años (Fig 1.1).

Actualmente, y debido a las numerosas investigaciones sobre el incremento de CO₂, se pueden conseguir informes y datos a lo largo de los últimos años de la concentración atmosférica de CO₂, determinados a través de satélite y por medidas directas, durante varias veces al día, en multitud de puntos de todo el planeta.

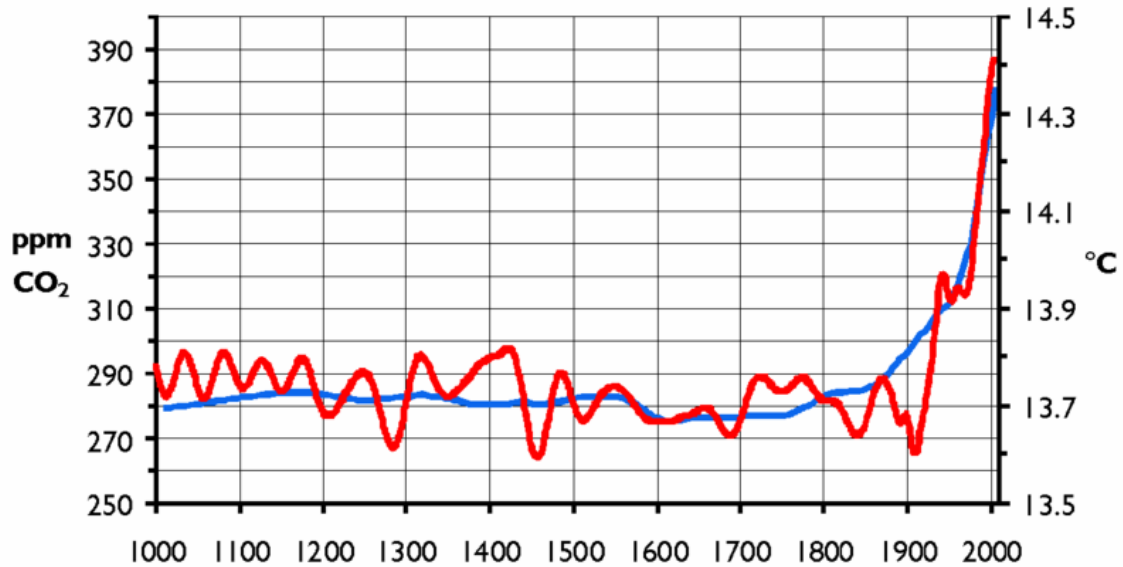


Fig 1.2. Gráfico de la concentración de dióxido de carbono en la atmósfera terrestre (azul) y la temperatura media global (rojo), en los últimos 1000 años. (<http://cdiac.esd.ornl.gov/trends/co2/lawdome.html>)

Durante el pasado y presente siglo se han observado también cambios en la concentración de CO₂ atmosférico (Fig.1.2.) y se ha visto que también hay diferencias a menor escala temporal. Como se puede ver en la Figura 1.2, y debido principalmente a la quema masiva de combustibles fósiles desde la revolución industrial, ha habido en los últimos 200 años un aumento exponencial de la concentración de CO₂ en la atmósfera.

El incremento actual de la concentración de CO₂ en la atmósfera es del orden de 1,2-1,5 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Watson et al. 1990) y se prevé que este incremento sea mayor en los próximos años. Así, durante este siglo se podría duplicar la concentración actual (Houghton et al. 1990) pasando de unos 370 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ actuales a unos 700 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ mol}^{-1}$. Por ello, el Panel Intergubernamental para el Cambio Climático (IPCC) ha predicho un aumento de la concentración atmosférica de CO₂ desde los 354 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ medidos en 1990 hasta los 530 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ para el año 2050 y

mas de 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ para el 2100 (Watson et al. 1990). Este incremento del CO_2 atmosférico provocará también un aumento de la temperatura global de 3 °C más para el 2050 y de 4 °C para el 2100 (Watson et al. 1990).

1.2. El CO_2 y las plantas

Hace muchos años que los investigadores se dieron cuenta de la importancia del CO_2 para las plantas. Van Helmot en 1648 observó que el incremento del tamaño de un sauce procedía principalmente de la atmósfera. La primera observación del crecimiento de plantas con CO_2 elevado la realiza de Saussure en 1890, aunque los primeros estudios realizados con plantas expuestas a CO_2 elevado datan de 1928 (Bolas & Henderson 1928). En las últimas décadas, debido a una mayor preocupación medioambiental y a la búsqueda de mejores técnicas que favoreciesen la producción agrícola, el número de trabajos sobre el efecto del CO_2 elevado sobre las especies vegetales se ha incrementado exponencialmente. La mayoría de estos trabajos están dirigidos principalmente a determinar el efecto del incremento de CO_2 atmosférico en la producción de biomasa y en la fotosíntesis (Kimball 1983a, b, Bazzaz 1990, Bowes 1991, Poorter 1993), concluyendo que el aumento de CO_2 es capaz de mejorar la producción de cultivos herbáceos, como se ha expuesto en las revisiones de Rosenberg (1981), Cure & Acock (1986), Mortensen (1987), Idso (1989), Allen (1990), Lawlor & Mitchell (1991), Poorter (1993), Rogers & Dahlman (1993) o Idso & Idso (1994), o bien en la producción de forestales como se ha expuesto en las revisiones de Eamus & Jarvis (1989), Idso e Idso (1994) o Curtis & Wang (1998). También se han realizado estudios sobre ecosistemas naturales (Drake & Leadley 1991, Drake 1992, Gifford 1992, Zanetti et al. 1996), aunque se le ha prestado una menor atención a la respuesta frente a una concentración elevada de CO_2 de estas plantas sin interés agrícola.

Por otro lado, en los últimos años, también se han publicado un buen número de trabajos dirigidos a comprender los cambios fisiológicos provocados por el crecimiento en CO_2 alto (Long 1991, Stitt 1991, Moore et al. 1999). Intentando esclarecer qué procesos bioquímicos regulan o controlan la fotosíntesis y cómo influyen sobre todo el CO_2 alto y la temperatura, aunque también otros factores como el estrés hídrico, la luz y

la falta de nutrientes (Aranjuelo et al. 2005), sobre la fisiología de las plantas y sobre la fotosíntesis en concreto.

En líneas generales, se puede decir que cuando otros factores, como luz, agua, temperatura y nutrientes son óptimos, la tasa fotosintética y el crecimiento de las plantas están limitados por la concentración ambiental de CO₂ y por tanto la fijación de CO₂ a través de la fotosíntesis se incrementa con concentraciones elevadas de CO₂. Pero cuando los demás factores son solo parcialmente limitantes, como en la mayoría de las ocasiones, una concentración más elevada de CO₂, permite aumentar también la fotosíntesis y el crecimiento, aunque en menor medida, ya que solo uno de los factores limitantes, el CO₂, ha sido aumentado (Idso & Idso 1994).

1.3. Asimilación fotosintética de CO₂

La fotosíntesis es un proceso fundamental para la vida en la tierra. Mediante la fotosíntesis los organismos autótrofos, entre los que se incluyen la mayor parte de las plantas, son capaces de servir de puerta de entrada a través de la cual la materia y la energía se incorporan a la biosfera (Medrano & Flexas 2000). Así, son capaces de transformar la energía lumínica proveniente del sol en energía química utilizable para las distintas reacciones metabólicas. Y además, son capaces de asimilar el CO₂ de la atmósfera, que junto con el hidrógeno proveniente del agua y los minerales que son absorbidos por las raíces, será la base estructural para la formación de distintos compuestos y en consecuencia, del crecimiento y desarrollo de la planta. Es decir, los productos de la fotosíntesis se transformaran en la base de la producción primaria de los ecosistemas y de la biosfera.

La fotosíntesis es, por tanto, el proceso por el cual las plantas son capaces de asimilar el CO₂ de la atmósfera y transformarlo en moléculas utilizando como fuente de energía la radiación solar. Es decir, es la conversión de energía solar en energía química útil biológicamente (Andréasson & Vänngard 1988, Arnon 1991).

Tradicionalmente, se ha dividido la fotosíntesis en dos fases, fase luminosa y fase oscura, aunque ya esta en desuso y no es del todo correcto, ya que ambos procesos se dan en la planta en presencia de luz. Pero cuando se descubrió el proceso por el que el CO₂ era fijado por el enzima de la carboxilación (Ribulosa-1,5- bisfosfato

carboxilasa/oxigenasa, Rubisco), se vio que no era dependiente de la luz, y que en laboratorio podía realizarse en ausencia de la misma, por eso se denominó fase oscura.

De hecho, para su estudio se sigue dividiendo la fotosíntesis en estas dos fases, por un lado la generación de poder reductor (NADPH) y de energía en forma de ATP a partir de la energía lumínica del sol y que es llevada a cabo gracias a la captura de energía de excitación por las antenas de los Fotosistemas, su transporte a los centros de reacción, y la cadena de transporte de electrones entre el Fotosistema II y el Fotosistema I. Y por otro lado, la fijación del CO₂ realizada por el enzima Rubisco, que se produce en el ciclo de Benson-Calvin. Ambos procesos están relacionados de forma que el ATP y el NADPH generados por el transporte electrónico serán utilizados en la fijación de CO₂ durante el ciclo de Benson-Calvin.

1.3.1. Transporte de electrones. Síntesis de ATP y generación de poder reductor (NADPH)

En las plantas C₃, el proceso fotosintético se desarrolla en los cloroplastos, que se encuentran en las células de las partes verdes de los vegetales (Edwards & Walker 1983, Lawlor 1987). Los fotosistemas son las unidades básicas para la realización de la fotosíntesis. Las clorofilas de las antenas reciben la luz solar y transmiten la energía absorbida en forma de excitones hasta el centro de reacción. Las plantas tienen dos fotosistemas, PSI y PSII. La energía que llega al PSII es transformada en energía electroquímica redox y comienza una cadena de transporte de electrones explicada por Hill & Bendall (1960) con el llamado esquema en Z que sintetiza el proceso de transferencia electrónica desde el agua al NADP⁺ y que incluye los dos fotosistemas, el complejo Cit b₆f y la fotólisis de una molécula de agua con liberación de O₂, para obtener poder reductor en forma de NADPH. Acoplada a este proceso está la fotofosforilación, de forma que el flujo de electrones en la cadena de transporte genera un gradiente protónico en la membrana del tilacoide, cuya descarga está asociada a la síntesis de ATP a través de la ATP sintasa. Esta energía química (ATP) y el poder reductor (NADPH) generados a partir de la energía solar por medio del transporte electrónico y la fotofosforilación, se utilizarán en el proceso de asimilación fotosintética de carbono (Lawlor 1993).

1.3.2. Ciclo de Benson-Calvin o ciclo reductor del carbono fotosintético

El ciclo fotosintético de reducción del carbono (CFRC) o ciclo de Benson-Calvin es el proceso por el cual las plantas son capaces de fijar el CO_2 y asimilarlo para que sea utilizado en la formación de distintas moléculas mediante diferentes rutas metabólicas. Este ciclo es el enlace entre el transporte de electrones y la síntesis de productos, y debe ser sensible a los cambios en relación al aporte y demanda de productos del transporte de electrones, tanto a corto como a largo plazo (Leegood 1990).

Durante la década de los cincuenta, Melvin Calvin, Andrew Benson, James A. Bassham y otros investigadores de la Universidad de Berkeley en California lograron dilucidar la ruta que seguía el carbono en la fotosíntesis (Malkin & Niyogi 2000, Benson 2002). Gracias a que el ^{14}C es radioactivo y se puede detectar su presencia mediante autorradiografía en un cromatograma, se pudieron conocer los primeros pasos de la asimilación del CO_2 y se pudo identificar el primer aceptor, Ribulosa 1,5-bisfosfato (RuBP), y el primer producto de su asimilación, 3-fosfoglicerato (3PGA). Investigaciones posteriores consiguieron desenmascarar la ruta completa de asimilación del CO_2 . Se pueden distinguir tres fases en el CFRC: Fijación del CO_2 o carboxilación, reducción a carbohidratos, y regeneración de la RuBP (Fig 1.3).

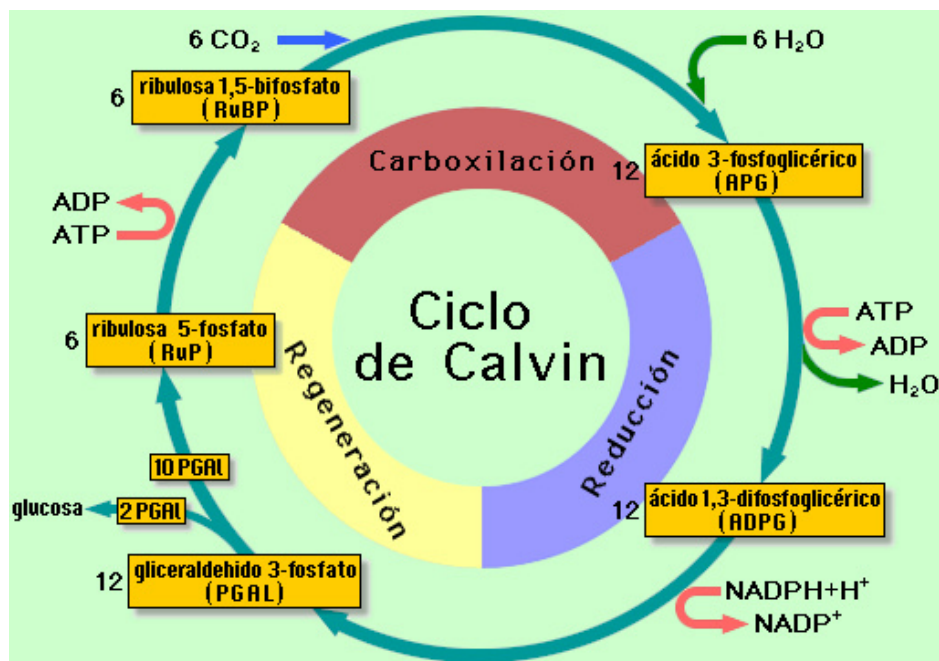


Fig 1.3. Ciclo de Benson-Calvin (Adaptado de Malkin & Niyogi 2000)

La carboxilación es la primera de las fases y en ella tiene lugar la fijación del CO_2 sobre una molécula de RuBP dando lugar a dos moléculas de PGA. Este proceso está mediado por un enzima, la Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (Rubisco). En la segunda fase reductiva, el PGA será reducido a gliceraldehido-3-fosfato (G3P) a expensas del ATP y el NADPH que se generaron en la fase luminosa. Con la tercera fase, fase regenerativa, se cierra el ciclo, ya que mediante una serie de isomerizaciones, condensaciones y reordenaciones, el G3P será transformado en pentosas fosfato como xilulosa-5-fosfato (Xu5P) y ribosa-5-fosfato (R5P). A partir de esta última y mediante una isomerización y posterior fosforilación se regenerará la RuBP a expensas de ATP.

Cada molécula de CO_2 fijado requiere por tanto de 3 ATP y 2 NADPH. En un ciclo completo, ocurren 3 reacciones de carboxilación con otras tantas moléculas de CO_2 y RuBP, produciéndose 6 moléculas de G3P. El producto neto de este ciclo es uno de los G3P generados, el que no se utiliza para la regeneración de la RuBP, y que servirá como fuente de carbono para la síntesis de almidón en el cloroplasto, o para la síntesis de sacarosa en el citosol.

1.3.3. Regulación del Ciclo Fotosintético de Reducción de Carbono

La fotosíntesis es un proceso complejo que debe funcionar de forma integrada y eficiente en un medio ambiente en el que hay una gran variedad de factores que afectan a la tasa fotosintética, tales como la luz, la temperatura, la humedad del aire, la disponibilidad hídrica del suelo y los nutrientes minerales (Azcon-Bieto et al. 2000) y, cómo no, la concentración atmosférica de CO_2 que es el principal sustrato de la fotosíntesis.

Existen diferentes mecanismos de regulación del ciclo de Benson-Calvin, tanto de la actividad carboxilasa de la Rubisco como de las otras enzimas del CFRC y de la formación de los distintos fotoasimilados. De la regulación de la actividad de la Rubisco se tratará en el punto siguiente.

En cuanto a las enzimas que actúan en el ciclo de Calvin hay, además de la disponibilidad de sustratos (CO_2 y RuBP), otros factores que regulan la actividad del CFRC. Se trata, principalmente, de las enzimas del ciclo que catalizan reacciones irreversibles (como las bisfosfatasas) o las que catalizan reacciones que requieren ATP o NADPH, ya que están sometidas a un fuerte control regulador (Medrano & Flexas

2000). La gliceraldehído 3-fosfato-deshidrogenasa, la fructosa-1,6-bisfosfatasa, la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa y la fosforribuloquinasa se regulan por el sistema ferredoxina/tiorredoxina mediado por luz (Malkin & Nigoyi 2000). Este sistema actúa variando el estado de oxidación del enzima. Con luz, la ferredoxina se reduce y los electrones se transfieren vía reductasa a la tiorredoxina, formándose tiorredoxina reducida. Esta tiorredoxina reducida activará los enzimas por reducción de sus puentes disulfuro. Se podría decir que estas enzimas son “activadas por luz”. Sin embargo esta regulación no permite un control variable de la actividad enzimática, es más bien un sistema de activación-desactivación.

La fructosa-1,6-bisfosfatasa y la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa pueden ser también activadas, como la Rubisco, por variaciones de pH y concentración de magnesio. Igual que el anterior, éste es un mecanismo para la activación de los enzimas durante el día y su desactivación durante la noche.

Hay un tercer mecanismo de regulación que sí permite un control variable de las actividades enzimáticas. La modulación de la actividad de los enzimas del ciclo por cambios en la concentración de sustrato, de forma que los niveles de sustratos o ciertas moléculas efectoras influyen en sus estados de activación (Scheibe 1987). A pesar de que, a excepción del PGA y de la RuBP, se observan variaciones muy pequeñas en las concentraciones de los metabolitos que actúan como sustratos de las distintas reacciones del CFRC en las hojas, se ha observado un control de la actividad enzimática por acción de un sustrato en un lugar diferente al sitio activo del enzima (Medrano & Flexas 2000). Por ejemplo, la fructosa-1,6-bisfosfato sensibiliza a la fructosa-1,6-bisfosfatasa a su activación por tiorredoxina. También, la fosforribuloquinasa es sensible a PGA, de forma que si aumenta la concentración de PGA disminuye la actividad del enzima. Este mecanismo ayuda a mantener constante la relación entre la producción de PGA, que depende de la actividad Rubisco, y la reducción de PGA, que depende de la generación de NADPH y ATP en la cadena de transporte electrónico. Se pone así de manifiesto la naturaleza autocatalítica del ciclo de Calvin, es decir que el nivel de los sustratos de reacción condiciona la actividad del propio enzima (Edwards & Walker 1983).

La tasa de fotosíntesis está también de algún modo regulada por el uso y transporte de los fotoasimilados, ya que la capacidad de la planta para utilizar los productos de la fotosíntesis es limitada y puede reducir las tasas de asimilación de CO₂ en las hojas. Tanto la sacarosa como el almidón proceden de las triosas-fosfato generadas a través del ciclo de Benson-Calvin. Cuando la capacidad de utilización de

los fotoasimilados está reducida, esto es, cuando la producción de triosas-fosfato en el cloroplasto excede la capacidad de utilizar sacarosa y almidón, disminuye la tasa de fotosíntesis, incluso cuando la hoja está en condiciones de elevada iluminación y alta concentración de CO₂. En estas condiciones de alta concentración de CO₂ e iluminación, la fotosíntesis está fuertemente determinada por la síntesis de sacarosa, ya que durante su formación en el citoplasma se libera fosfato inorgánico que volverá al cloroplasto en intercambio estequiométrico con triosas-fosfato y será necesario para la síntesis de ATP (Herold 1980, Foyer 1987, Huber 1989, Goldschmidt & Huber 1992).

1.4. Enzima Rubisco

La Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco, EC 4.1.1.39) es la proteína soluble más abundante en el cloroplasto y posiblemente es la más abundante de la biosfera, ya que se encuentra (aunque en ciertos organismos con estructuras menos complejas que en las plantas) en todos los organismos que realizan la fotosíntesis.

En plantas, es un complejo enzimático cuyo peso molecular es de 560 kDa formado por 8 copias de una subunidad grande de 54 kDa y 8 copias de una subunidad pequeña de unos 16 kDa. Las subunidades grandes (llamadas L, large) forman un núcleo octamérico mientras que las subunidades pequeñas (llamadas S, small) se disponen alrededor formando dos capas de 4 unidades cada una. Las subunidades L son codificadas por ADN cloroplástico y sintetizadas en el cloroplasto, mientras que las subunidades S se transcriben en el núcleo y son sintetizadas en el citosol como un precursor de la subunidad pequeña, que será transformado en su forma madura al pasar al cloroplasto. Dentro del cloroplasto las diferentes subunidades de la Rubisco se unen mediante la participación activa de chaperoninas cloroplásticas, la chaperonina cpn60 será necesaria para el plegamiento correcto de la subunidad grande, formándose el holoenzima funcional (Malkin & Nigoyi 2000). Cada subunidad grande tiene un centro activo, de modo que cada molécula de Rubisco tiene 8 centros activos, en los que se llevará a cabo la carboxilación.

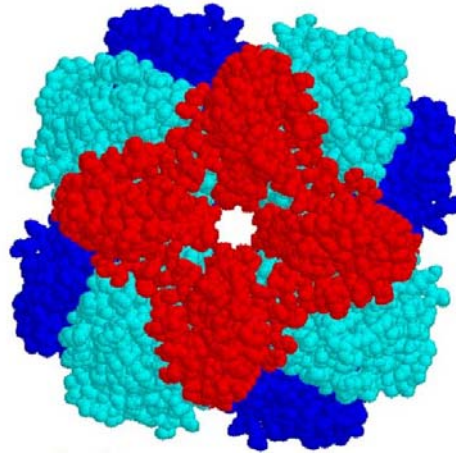


Fig 1.5 Estructura tridimensional del enzima Rubisco. (Spreitzer RJ & Salvucci ME 2002)

La Rubisco tiene una doble función enzimática que se realiza en los mismos sitios activos del enzima y sobre la misma molécula, la RuBP. Puede fijar una molécula de CO_2 a la RuBP, proceso que se denomina carboxilación, o puede fijar una molécula de O_2 a la RuBP, realizando la reacción de oxigenación e iniciando el proceso de la fotorrespiración (Bowes et al. 1971). Mediante la carboxilación, al unir un CO_2 a la RuBP se formarán dos moléculas de 3-PGA que se utilizarán en el ciclo de Benson-Calvin como se ha visto anteriormente. En cambio, en la reacción de oxigenación, el enzima cataliza la producción de una molécula de fosfoglicerato, que se metaboliza a través del ciclo de Benson-Calvin, y una de 2-fosfoglicolato. Este último producto se procesa a través de la ruta del glicolato y, después de liberar CO_2 , se reconvierte parcialmente en fosfoglicerato, de manera que puede ser asimilado de nuevo por el ciclo de Calvin (Andrews & Lorimer 1978).

La fotorrespiración reduce la eficiencia en la fijación del CO_2 hasta en un 50% (Schneider et al. 1992), y como consume ATP y poder reductor, disminuye la eficiencia energética de la fotosíntesis. Se ha propuesto que probablemente la oxigenación es una reacción que la Rubisco realizaba cuando la atmósfera en la Tierra era anoxigénica (Lorimer 1981) y que el enzima ha arrastrado en su evolución. Posteriormente, se habría desarrollado la ruta fotorrespiratoria con objeto de eliminar el 2-fosfoglicolato, que es un inhibidor de uno de los enzimas del ciclo de Calvin, la triosa fosfato isomerasa (Leegood et al. 1995), y de recuperar parte del carbono invertido en la formación del 2-fosfoglicolato. Sin embargo, existen evidencias de que la vía fotorrespiratoria ha

adquirido funciones adaptativas adicionales en la protección celular frente al estrés oxidativo (Kozaki & Takeba 1996) y en la reasimilación del amonio (Keys 2006).

Debido a esta doble función carboxilasa/oxigenasa de la Rubisco, CO_2 y O_2 son sustratos e inhibidores competitivos (Farquhar et al. 1980) del enzima. La competición entre carboxilación y oxigenación dependerá de la concentración de CO_2 y O_2 (ratio CO_2/O_2) y de las propiedades cinéticas del enzima. A pesar de que la ratio CO_2/O_2 es baja, ya que la concentración de O_2 en la atmósfera es del 21% y la de el CO_2 es de 0,035-0,037%, la concentración de CO_2 no resulta un factor limitante porque la afinidad de la Rubisco por el CO_2 es mayor. En efecto, la constante de Michaelis-Menten (K_m) para el CO_2 es $K_m = 12 \mu\text{M}$ mientras que para el O_2 es $K_m = 250 \mu\text{M}$ (Medrano & Flexas 2000). Esto permite que la baja concentración atmosférica de CO_2 con respecto al O_2 sea suficiente para permitir la carboxilación.

1.4.1. Regulación de la actividad Rubisco. Rubisco Activasa

Los centros activos de la Rubisco se encuentran localizados en la interfase entre dos subunidades grandes del mismo dímero (Lorimer et al. 1987, Hartman et al. 1986). Para que los centros activos de la Rubisco sean catalíticamente competentes, necesitan ser carbamilados por un CO_2 (Fig 1.6), y estar libres de azúcares fosfato que actúen como inhibidores (Badger & Collantz 1977). Esta carbamilación se produce con un CO_2 distinto del que el enzima va a fijar a la RuBP y provocará la pérdida de dos protones de una lisina de la Rubisco (Lorimer et al. 1976, Portis 2003). Esta carga negativa del carbamato formado necesita de la unión de Mg^{+2} para que el enzima esté activo. Este proceso de carbamilación y unión con Mg^{+2} requiere un pH elevado. Estas condiciones se producen en presencia de luz, ya que con iluminación, en los cloroplastos los protones son translocados al interior del lumen tilacoidal aumentando así el pH en el estroma. La concentración de Mg^{+2} en el estroma también se ve aumentada en estas condiciones, convirtiéndose de este modo la luz en el principal activador de la Rubisco.

Por otro lado, hay que tener en cuenta los inhibidores que actúan sobre la Rubisco. En los sitios activos del enzima, incluso estando carbamilados, se pueden unir intermediarios del CFRC como fructosa-1,6-bisfosfato (FBP), NADPH, 6-fosfogluconato, Pi y PGA que actuarán como inhibidores competitivos (Badger & Lorimer 1981). Además, otros compuestos inhibidores incluyen a isómeros y epímeros de RuBP (Andrews 1996, Crafts-Brandner & Salvucci 2000) como la D-xilulosa 1,5-

bisfosfato, el 3-ceto-Darabinitol 1,5 bisfosfato, el D-glicero-2,3-diulosa-1,5-bisfosfato (pentodiulosa bisfosfato), y el carboxitritol bisfosfato (Kane et al. 1998), formados por reacciones laterales derivadas del mecanismo catalítico de la Rubisco. También es necesario eliminar los inhibidores nocturnos como el 2 carboxiarabinitol 1-fosfato (CA1P), un inhibidor natural sintetizado en algunas especies de plantas superiores durante periodos de oscuridad, de los sitios activos del enzima (Vu et al. 1984, Seemann et al. 1985).

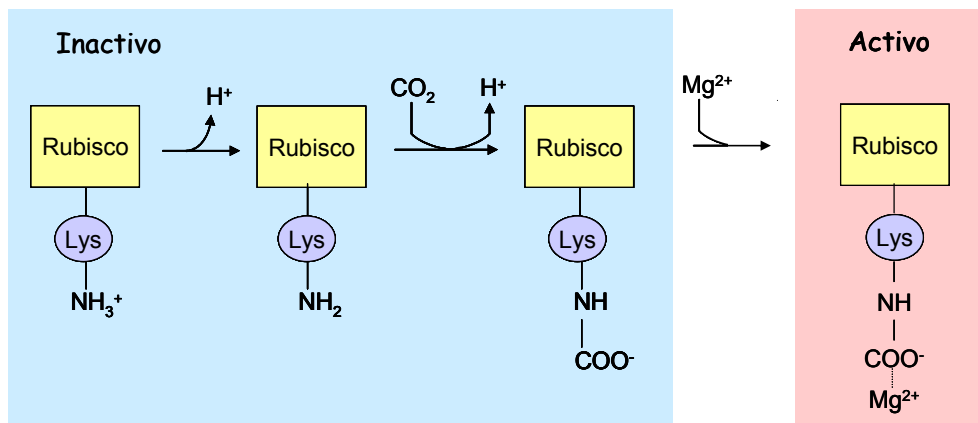


Fig1.6. Esquema de la carbamilación de la Rubisco. (Adaptado de Malkin & Nigoyi 2000)

Para facilitar la desunión de estos azúcares fosfato de los sitios activos del enzima, en los cloroplastos existe una proteína llamada Rubisco activasa (Portis 1995, Salvucci & Ogren 1996). La Rubisco activasa se encuentra en todas las plantas superiores y en algas, donde es codificada por el genoma nuclear, habiéndose detectado también en algunas cianobacterias (Hartman & Harpel 1994). La Activasa es una ATPasa que actúa como chaperonina de la Rubisco, cambiando su conformación, y deshaciendo las uniones de dicho enzima con azúcares fosfato (Wang & Portis 1992). Así, promueve la “activación” de la Rubisco (Crafts-Brandner & Salvucci 2000) facilitando la liberación tanto de los sitios no carbamilados y ocupados por RuBP y sus análogos como de los sitios carbamilados que contienen análogos de RuBP e intermediarios de la propia reacción (Portis 1995, Salvucci & Ogren 1996). Andrews et al. (1995), Mate et al. (1996) y Salvucci & Ogren (1996) propusieron un mecanismo de actuación de la activasa. Sugirieron un modelo mecánico según el cual la activasa sería capaz de abrir el bucle polipeptídico que encierra estrechamente a los ligandos en los centros activos dentro de la estructura protéica. De forma que cuando la activasa se

activa mediante hidrólisis de ATP, reconoce la Rubisco con el bucle proteico cerrado y se une a ella, provoca la apertura del bucle y se libera el ligando a la vez que la activasa vuelve a su forma inactiva. La activasa reconoce tanto las formas carbamiladas, y por tanto susceptibles de realizar carboxilación, como las no carbamiladas (no susceptibles de realizar carboxilación) ambos con ligandos unidos, pero cuando el ligando que tiene unido es RuBP, la catálisis de la Rubisco abre rápidamente el bucle proteico y no requiere la ayuda de la activasa (Von Caemmerer & Quick 2000) de esta manera no hay pérdidas en la carboxilación por la actividad de la activasa.

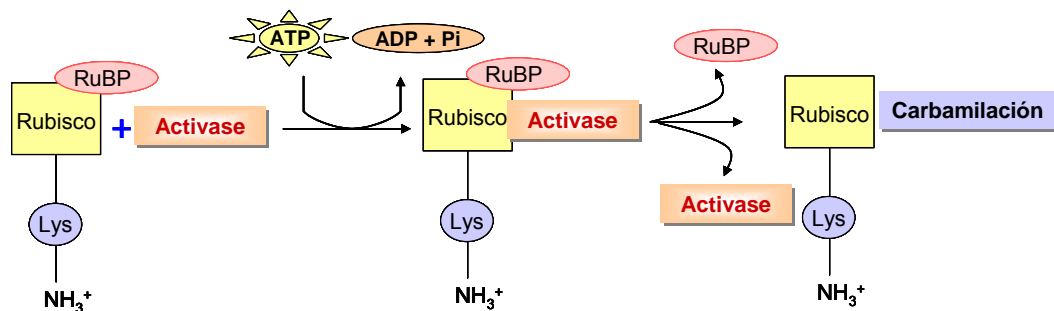


Fig1.7. Esquema de actuación de la Rubisco activasa. (Adaptado de Malkin & Nigoyi 2000)

La activasa se puede utilizar para calcular la cantidad de sitios activos del enzima que pueden realizar la reacción de carboxilación y con ello conocer el estado de activación de la Rubisco (Robinson & Portis 1989, Crafts-Brandner & Salvucci 2000).

1.5. Un modelo para la fijación fotosintética de CO₂

La tasa neta de asimilación de CO₂ (A) esta determinada por procesos biofisicos, dentro de los que se incluyen el transporte del CO₂ a través de la hoja y los estomas, y los procesos bioquímicos que se producen en las membranas de los tilacoides y en el estroma del cloroplasto, en las mitocondrias y en el citosol de la célula (Sarkey et al. 2007).

La velocidad de la fotosíntesis puede venir dada por una limitación de la concentración de CO₂, donde serán las propiedades de la Rubisco las que limiten la asimilación de CO₂, suponiendo un suministro saturante del otro sustrato, la RuBP. En

este caso se dice que la fotosíntesis esta limitada por Rubisco y normalmente ocurre cuando la concentración de CO_2 es baja (Sarkey et al. 2007). De igual modo, la velocidad de la fotosíntesis puede estar definida por la regeneración de RuBP, que dependerá del NADPH y el ATP generados a partir de la cadena de transporte electrónico fotosintético aunque también puede depender de enzimas del ciclo de Benson-Calvin distintos de la Rubisco. En este segundo caso se dice que la fotosíntesis esta limitada por regeneración de RuBP y suele ocurrir con concentraciones altas de CO_2 .

Dado que tanto el CO_2 como la RuBP son sustratos de la Rubisco, el exceso de uno de los sustratos no puede compensar la deficiencia del otro, de modo que para una determinada concentración y grado de activación de la Rubisco, la disponibilidad de uno de los dos sustratos resultará limitante de la velocidad fotosintética (Medrano & Flexas 2000). Así, a concentraciones bajas de CO_2 en el interior del cloroplasto (presión parcial de CO_2 baja), la velocidad de asimilación de CO_2 aumenta linealmente al hacerlo el CO_2 (Fig 1.8), estando limitada la fotosíntesis por la actividad de la enzima Rubisco. Sin embargo, a partir de determinada concentración de CO_2 la velocidad de asimilación aumenta con éste sólo ligeramente (Fig 1.8), debiéndose este aumento a la inhibición gradual de la oxigenación. Esto ocurre porque no hay disponibilidad del otro sustrato, RuBP, y lo que esta limitando la fotosíntesis es la regeneración del mismo.

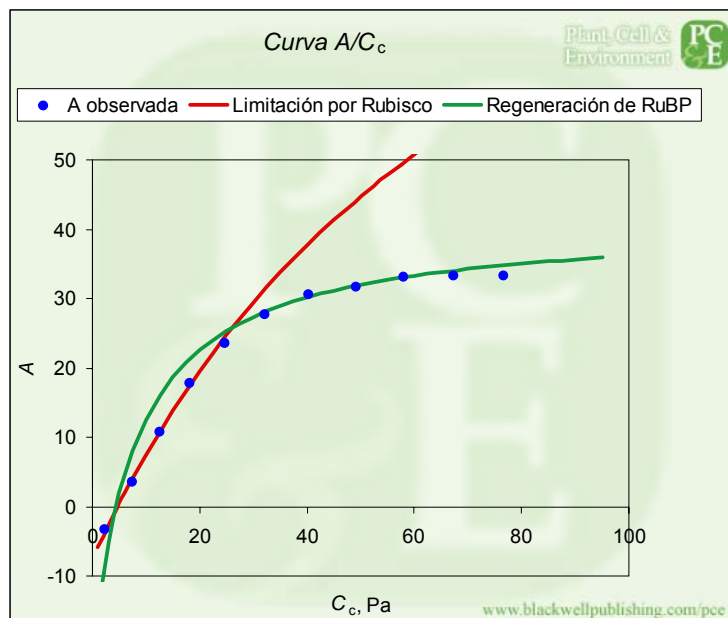


Fig 1.8. Curva A/C_i de respuesta de la fotosíntesis al aumento de $[\text{CO}_2]$ intercelular, donde se observa la limitación por Rubisco y la limitación por regeneración de RuBP. (Sharkey et al. 2007)

1.5.1. Formulación matemática del modelo

Farquhar et al. (1980) describieron un modelo para la fotosíntesis en las hojas que está ampliamente probado y contrastado (Long 1991). En el ciclo fotosintético de reducción del carbono se forman 2 moles de PGA por mol de RuBP. Por su parte, en el ciclo de la fotorrespiración, por cada mol de RuBP se forma 1 mol de PGA y 1 mol de fosfoglicolato, que libera 0.5 moles de CO₂. Además, en la luz hay respiración mitocondrial de cierta cuantía, normalmente menor que en la oscuridad. Por tanto, la velocidad neta de fijación de CO₂ puede expresarse:

$$A = V_c - 0.5V_o - R_d \quad \text{Ec. 1.1}$$

donde V_c y V_o son las velocidades de carboxilación y oxigenación y R_d la velocidad de respiración mitocondrial en la luz. La ecuación puede simplificarse introduciendo ϕ , la razón entre V_o y V_c :

$$A = V_c(1 - 0.5\phi) - R_d \quad \text{Ec. 1.2}$$

La razón entre las velocidades de oxigenación y carboxilación depende sólo de las constantes cinéticas de la Rubisco:

$$\phi = \frac{V_o}{V_c} = (V_{o\max} \frac{K_c}{K_o} V_{c\max}) \left(\frac{O}{C} \right) = \frac{1}{\tau} \cdot \frac{O}{C} \quad \text{Ec. 1.3}$$

donde $V_{c\max}$, $V_{o\max}$, K_c y K_o son las velocidades máximas y las constantes de Michaelis-Menten de la carboxilación y la oxigenación, respectivamente. τ es la especificidad de la Rubisco para el CO₂ respecto al O₂, y C y O son las concentraciones de CO₂ y O₂ en el cloroplasto. De la Ec. 1.2 se deduce que cuando $R_d = 0$, $A = 0$ cuando $\phi = 2$. La concentración de CO₂ en el cloroplasto a la que ocurre esto se ha denominado Γ^* , y de la Ec. 1.3 se sigue que:

$$\Gamma^* = \frac{0.5O}{\tau} \quad \text{Ec. 1.4}$$

$$\phi = \frac{2\Gamma^*}{C} \quad \text{Ec. 1.5}$$

Sustituyendo en la Ec. 1.2:

$$A = \left(1 - \frac{\Gamma^*}{C}\right) \cdot V_c - R_d \quad \text{Ec.1.6}$$

Farquhar (1980) mostró que, debido a la alta concentración de Rubisco en el cloroplasto, la velocidad de carboxilación puede describirse, como ya se ha indicado, por la velocidad saturada por RuBP (limitada por la Rubisco), o por la velocidad limitada por la RuBP. El suministro de RuBP, por su parte, está ligado a la regeneración de la misma, que depende del suministro de ATP y NADPH a partir de la cadena de transporte de electrones. Esto llevó a formular la velocidad de asimilación de CO₂ bien como saturada por la RuBP (limitada por la Rubisco, A_c), que ocurriría cuando la irradiancia es alta o la concentración de CO₂ baja, o bien como limitada por la velocidad de regeneración de RuBP (A_j), que ocurriría cuando la irradiancia es baja o el CO₂ es alto. En una situación dada, la asimilación de CO₂ dependería de aquella de las dos velocidades que fuese menor.

$$A = \min(A_c, A_j) - R_d \quad \text{Ec. 1.7}$$

En el primer caso, V_c en la Ec. 1.6 sería la velocidad de carboxilación limitada por la Rubisco, que, como se detallará en la sección de Material y Métodos, tiene la forma típica de una ecuación de Michaelis-Menten con respecto a su substrato, CO₂.

La formulación de la velocidad de carboxilación limitada por la regeneración de RuBP relaciona a ésta directamente con la velocidad de transporte de electrones. En la regeneración de RuBP a partir de PGA, a una velocidad de (1+ φ)V_c, se requiere primero 1 ATP y 1 NADPH en la fosforilación y reducción de cada uno de los dos PGA. En la oxigenación se producen φ mol de PGA y φ mol de fosfoglicolato, requiriendo los primeros φ NADPH y φ ATP en la fosforilación y reducción. En la fotorrespiración se libera y vuelve a fijar 0.5 mol de amonio, que requiere 1 mol de

ferredoxina, que en términos de transporte de electrones es equivalente a 0.5ϕ de NADPH y 0.5ϕ de ATP. La regeneración de 0.5ϕ de PGA desde ϕ de fosfoglicolato producido en la oxigenación requiere 0.5ϕ de ATP en el paso final, así como 0.5ϕ de NADPH y 0.5ϕ de ATP en su fosforilación y reducción. Por su parte, la fosforilación de $1 + \phi$ de Ribosa-5- P a RuBP consume $1 + \phi$ de ATP. La suma de estos consumos es:

$$\text{Velocidad de consumo de NADPH} = (2 + 2\phi) \cdot V_c \quad \text{Ec. 1.8}$$

$$\text{Velocidad de consumo de ATP} = (3 + 3.5\phi) \cdot V_c \quad \text{Ec. 1.9}$$

La reducción de NADP requiere el transporte de 2 electrones a través de la cadena, lo que a su vez requiere 4 fotones, dos por cada Fotosistema. La velocidad de transporte de electrones, J , requerida para los ciclos de carboxilación y oxigenación se puede calcular a partir de la velocidad de consumo de NADPH (Ec. 1.8):

$$J = (4 + 4\phi) \cdot V_c \quad \text{Ec. 1.10}$$

El cálculo de la velocidad de transporte de electrones requerida para satisfacer el consumo de ATP tiene mayor incertidumbre. El transporte de electrones está acoplado al de protones a través de la membrana de los tilacoides, con una estequiometría que no se conoce con certeza. Tampoco se sabe con seguridad el número de protones requerido para la síntesis de ATP, que puede ser algo flexible. La razón entre transferencia de protones y producción de ATP se estima en 3 o 4, que conduce, respectivamente, a:

$$\text{Velocidad de producción de protones} = (9 + 10.5\phi) \cdot V_c \quad \text{Ec. 1.11}$$

$$\text{Velocidad de producción de protones} = (12 + 14\phi) \cdot V_c \quad \text{Ec. 1.12}$$

Farquhar y von Caemmerer (1982) supusieron que el movimiento de 2 electrones a través de la cadena de transporte conduce a la acumulación de 4 protones en el lumen de los tilacoides, 2 de la rotura de la molécula de H_2O y 2 de la oxidación del pool de plastoquinona formado como consecuencia del transporte de los electrones

desde el agua. Si el electrón pasa directamente al Fotosistema I, la razón H^+/e^- es 2; si se transfiere sólo 1 protón al Fotosistema I y el otro es devuelto al pool de plastoquinona y reutilizado (ciclo Q), H^+/e^- es 3. En el primer caso y con $3H^+/ATP$, la velocidad de transporte de electrones requerida para satisfacer la necesidad de ATP para la carboxilación y la oxigenación es:

$$J = (4.5 + 5.25\phi) \cdot V_c \quad \text{Ec. 1.13}$$

si hay una razón $H^+/e^- = 3$:

$$J = (3 + 3.5\phi) \cdot V_c \quad \text{Ec. 1.14}$$

En ambos casos hay una discrepancia entre las necesidades para la producción de NADPH y ATP, que puede satisfacerse a través de la reacción de Mehler, en la que el O_2 actúa comoceptor de electrones, o con un flujo cíclico de electrones alrededor del Fotosistema I. Este último tiene una razón $H^+/e^- = 1$ y precisa sólo 1 protón. Si opera el ciclo Q ($H^+/e^- = 3$) y hay una razón $4H^+/ATP$, la necesidad de transporte de electrones en la cadena completa es:

$$J = (4 + 4.66\phi) \cdot V_c \quad \text{Ec. 1.15}$$

y la discrepancia se reduce a $(0.66\phi) V_c$, que es mucho menor (von Caemmerer 2000). La velocidad de asimilación de CO_2 cuando la carboxilación está limitada por la regeneración de RuBP, que se formulará en el apartado correspondiente a Material y Métodos, se basa en estas estimaciones del transporte de electrones.

Hay un tercer factor que limita la fotosíntesis, la regeneración de RuBP controlada por el Uso de las Triosas Fosfato (TPU) (Sharkey 1985). Sharkey et al. (2007) indican que esto ocurre cuando las reacciones cloroplásticas tienen una mayor capacidad que la capacidad de la hoja para utilizar los productos de los cloroplastos, principalmente las triosas fosfato, aunque no solamente éstos. En estas condiciones la fotosíntesis no responde al aumento de CO_2 , ni es inhibida por el incremento de la concentración de O_2 (Sharkey 1985). La formula que la define es:

$$A = 3TPU - R_d \quad \text{Ec. 1.16}$$

donde TPU es la tasa de uso de las triosas fosfato, donde se incluye todo el carbono exportado del ciclo de Calvin incluido el uso directo de glicina o serina fotorrespiratorias (Sharkey et al. 2007).

En este modelo, muchos parámetros fueron asignados a priori. Por ejemplo, se estableció que las constantes cinéticas de la Rubisco eran similares entre especies C_3 , por ello se utilizaron las mismas. En posteriores investigaciones in vitro se encontraron valores menores de estas constantes (Jordan & Ogren 1981, 1984, Makino et al. 1988). En un gran número de trabajos (Kirschbaum & Farquhar 1984, Collatz et al. 1991, Harley & Sharkey 1991, von Caemmerer & Evans 1991) se realizaron estudios in vitro donde las constantes de Michaelis-Menten para el CO_2 y el O_2 (K_c y K_o) fueron medidas, con valores entre 9 y 21 μM para K_c y entre 196 y 650 μM para K_o en diferentes especies de plantas C_3 . Debido a esto, cuando la fotosíntesis está limitada por la actividad Rubisco, el único parámetro no asignado a priori fue la actividad Rubisco máxima (V_{cmax}), que es dependiente de la cantidad de proteína Rubisco presente en la hoja (von Caemmerer 2000).

Cuando la fotosíntesis esta limitada por la regeneración de RuBP, se debe tener en cuenta tanto Γ^* como la dependencia del transporte electrónico respecto de la luz. Pero el parámetro a tener más en cuenta es la capacidad máxima de este último (J_{max}), que dependerá de la cantidad de proteínas tilacoidales presentes (von Caemmerer 2000).

Las unidades de V_{cmax} y J_{max} son $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ y es importante conocer el comportamiento de ambos parámetros en la fotosíntesis de las hojas y frente a cambios en la disponibilidad de CO_2 y otros factores que controlan o limitan la fotosíntesis. V_{cmax} y J_{max} pueden ser calculadas de las zonas de baja y alta concentración intercelular de CO_2 (C_i), respectivamente, de las curvas de respuesta de A a C_i (Farquhar et al. 1980) que se pueden obtener de medidas de intercambio gaseoso en hojas de plantas vivas.

1.5.2. Dependencia de la temperatura de los parámetros de la fotosíntesis

El modelo de Farquhar et al. (1980) fue desarrollado para una temperatura de la hoja de 25 °C. Pero un problema en la aplicación del modelo es que, con los parámetros que normalmente se utilizan, éste es incapaz de ser preciso en la predicción de la asimilación de carbono dentro del rango de temperaturas en el que, en el medio natural, se produce la fotosíntesis (Bernacchi et al. 2001). Por ello, la necesidad de estimar correctamente la dependencia de la temperatura de los parámetros cinéticos de la Rubisco, se ha puesto de manifiesto al intentar predecir el impacto del incremento global de la concentración de CO₂ y de la temperatura (Bowes 1991, Long 1991, Walcroft et al. 1997, von Caemmerer & Quick 2000). La dependencia de la temperatura de las constantes cinéticas se puede describir con una función de Arrhenius.

1.6. Efectos del cambio climático sobre las plantas

Como se ha dicho anteriormente (Apartado 1.1), el cambio climático está regido por un aumento de los gases de efecto invernadero, predominantemente del CO₂. Una consecuencia de este aumento de la concentración atmosférica de CO₂ es el calentamiento del clima, ya que un incremento en la temperatura podría estar unido a un considerable aumento de la concentración atmosférica de CO₂ (Long 1991).

El aumento de la concentración atmosférica de CO₂ sobre los valores actuales aumentará la fotosíntesis en las plantas C₃ porque la Rubisco no está saturada por el sustrato y la oxigenación se verá inhibida (Long et al. 2004). Por otro lado, el aumento de temperatura afectará a los parámetros cinéticos que definen la fotosíntesis. Así, cabe esperar que en las plantas C₃ ambos aumentos, de CO₂ y temperatura, tengan influencia sobre la tasa de asimilación fotosintética a través de su efecto directo sobre la carboxilación (Long 1991).

1.6.1. Efecto del CO₂ elevado sobre la fotosíntesis

Los efectos del aumento del CO₂ en la atmósfera sobre la fotosíntesis han sido ampliamente estudiados (Drake et al. 1997, Morison & Lawlor 1999, Stitt & Krapp 1999). Un aumento en el CO₂ aumentará la fotosíntesis, al ser este gas el sustrato principal de dicho proceso. Para las plantas C₃ la concentración actual de CO₂ atmosférico es subóptima, por lo tanto se supone que se producirá un “efecto fertilizante” ya que el aumento de CO₂ atmosférico se traducirá en un mayor crecimiento de las plantas. De hecho, la fotosíntesis por unidad de superficie foliar aumenta con la concentración de CO₂ (Fig1.8) porque se reduce la limitación de sustrato en la catálisis de la Rubisco, y porque disminuye competitivamente la oxigenación (Long 1991). Más aún, el aumento de CO₂ incrementa la eficiencia del uso de la luz en la asimilación neta de CO₂, dando lugar a un aumento del crecimiento y por tanto de la velocidad de producción de superficie foliar. Esto se refuerza por una disminución del uso de agua, como se expone más abajo, que acelera más el desarrollo foliar. Como consecuencia de estos cambios, se produce una serie de respuestas secundarias, como un aumento de los carbohidratos no estructurales, una mejora del estado hídrico de la planta, y en muchos casos disminuciones de la razón C/N, de la densidad de los estomas y de la relación de masas raíz/tallo (Drake et al. 1997).

El IPCC reconoció que podía haber, en las plantas, una estimulación directa de la producción como resultado del aumento del CO₂ atmosférico, pero sugirió que un crecimiento prolongado en CO₂ elevado podría reducir esta estimulación “porque otros factores como la baja disponibilidad de nutrientes podría limitar la toma de CO₂” (Melillo et al. 1990). En realidad se ha visto que la exposición prolongada al CO₂ elevado desencadena frecuentemente un proceso de aclimatación fotosintética, también conocido como “regulación a la baja” (down-regulation), de forma que tras un crecimiento prolongado en una atmósfera con enriquecimiento de CO₂, las plantas son a menudo incapaces de mantener la estimulación inicial de la fotosíntesis (Rogers & Humphries 2000). Esta disminución de la capacidad fotosintética conlleva alteraciones en el intercambio gaseoso que son indicativas de una disminución en la capacidad de carboxilación (Stitt 1991) y en la actividad o cantidad de Rubisco (Drake et al. 1997).

La aclimatación fotosintética se debe, por tanto, a una disminución de la actividad (reducción de V_{cmax}) y cantidad de Rubisco, asociada con descensos en los

transcritos de la subunidad pequeña del enzima (Drake et al. 1997, Moore et al. 1999) y que se ha atribuido a una represión de la expresión génica de este enzima como consecuencia del aumento de la concentración de carbohidratos (Sheen 1990; Krapp et al. 1993; Moore et al. 1999). Sin embargo, como esta aclimatación negativa de la Rubisco no se observa cuando el suministro de nitrógeno es abundante, aunque se acumulen carbohidratos (Geiger et al. 1999), otros autores han concluido que la disminución de la capacidad fotosintética en CO₂ elevado se debe a una reducción del contenido de nitrógeno y proteínas en las hojas (Sicher & Bunce 1997, Nakano et al. 1997). Este efecto se ha atribuido a una dilución del nitrógeno debida a la aceleración del crecimiento en CO₂ elevado, de modo que cuando el nitrógeno se añade en proporción directa al crecimiento, no hay aclimatación de la fotosíntesis aunque haya deficiencia de este nutriente (Farage et al. 1998).

Las hipótesis elaboradas para explicar este fenómeno de la aclimatación sugieren que en él pueden intervenir, tanto las limitaciones relacionadas con la eficiencia de la carboxilación (Long et al. 2004) como las impuestas por la conductancia de los estomas (Sánchez-Díaz et al. 2004). Junto con un aumento de la fotosíntesis, el aumento de la concentración de CO₂ provoca un cierre de los estomas (Long et al. 2004). Sin embargo, no se conoce todavía el mecanismo por el que los estomas perciben el CO₂ y dónde se percibe en la hoja. Los estudios de intercambio gaseoso de Mott (1988) concluyeron que los estomas responden al CO₂ intercelular, no al del aire externo, lo que explica la notable constancia de la relación entre CO₂ intercelular y externo que se observa frecuentemente. A pesar del cierre parcial de los estomas al aumentar el CO₂, la limitación que éstos imponen sobre la fotosíntesis disminuye en CO₂ elevado (Long et al. 2004). En cambio, la disminución de la conductancia de los estomas disminuye notablemente la transpiración y, por tanto, aumenta la eficiencia en el uso del agua. No obstante, aún no está claro si los estomas experimentan una aclimatación al crecimiento en CO₂ elevado paralela o independiente de la aclimatación fotosintética en el mesofilo (Morison 1998). La constancia de la razón entre el CO₂ intercelular y el del aire externo es indicativa de una relación estrecha entre ambos procesos, pero algunos estudios sobre la sensibilidad de los estomas al cambio en la concentración de CO₂ (Lodge et al. 2001) y sobre la relación entre fotosíntesis y conductancia de los estomas (Medlyn et al. 2001) sugieren que la aclimatación de los estomas es independiente de la aclimatación fotosintética.

El CO₂ elevado puede también afectar a la velocidad de carboxilación por unidad de superficie foliar a través de cambios en la anatomía de las hojas, tales como el número de células del mesófilo, el grosor de este tejido o la masa por unidad de superficie foliar (Peterson et al. 1999). De cualquier manera, se puede decir que la aclimatación fotosintética posee un grado de respuesta muy variable dependiendo de la especie, la nutrición mineral y la influencia de otros estreses (Poorter & Pérez-Soba 2001).

1.6.2. Efecto del aumento de temperatura sobre la fotosíntesis

Los procesos metabólicos, incluida la fotosíntesis, se ven limitados a temperaturas por debajo de las óptimas debido a que los sustratos no alcanzan la energía de activación necesaria. Al aumentar la temperatura, la tasa de reacción se incrementa linealmente, hasta alcanzar un máximo en la temperatura óptima (Larcher 2003). Una vez llegado a este punto, un aumento en la temperatura no modifica la velocidad de reacción, hasta que debido al exceso térmico se produce una inhibición de la misma. Las enzimas se inhiben y se producen cambios en la fluidez de las membranas, llegándose a una tasa de reacción nula.

El proceso fotosintético se ve afectado por el exceso de temperatura tanto a nivel metabólico, por cambios en las actividades enzimáticas del ciclo de Benson-Calvin, como a nivel de la estructura de los tilacoides, donde se producen modificaciones en la energía de excitación (Berry & Björkman 1980, Weis & Berry 1988). Bajo condiciones naturales, el óptimo térmico para la fotosíntesis neta de plantas C₃ es menor que el óptimo para la capacidad fotosintética potencial a CO₂ de saturación, porque las altas temperaturas incrementan las tasas de fotorrespiración (Larcher 2003) y la respiración mitocondrial. Aunque los valores térmicos óptimos para la fotosíntesis son específicos de cada planta, en general se sitúan entre 15 y 30°C.

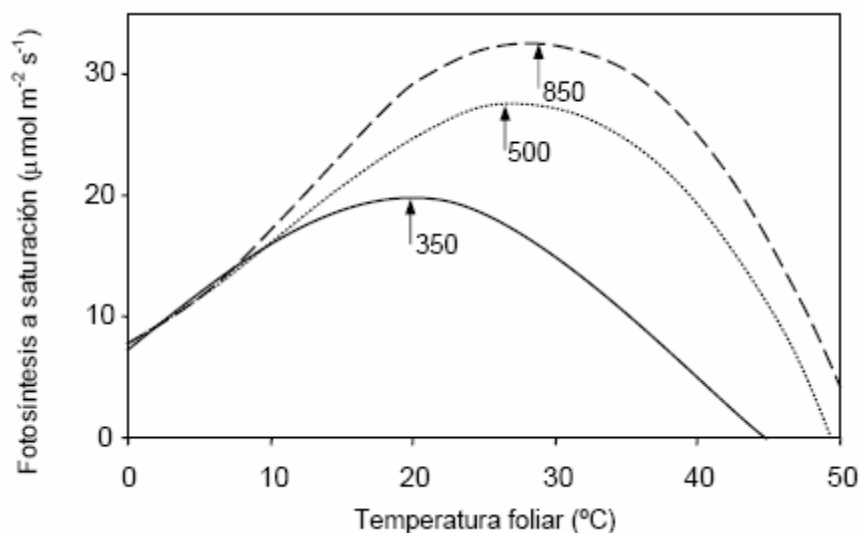


Fig 1.9. Tasas fotosintéticas a saturación de luz, con diferentes temperaturas foliares, para tres concentraciones de CO₂ (350 µmol mol⁻¹, línea continua; 500 µmol mol⁻¹, línea punteada; 850 µmol mol⁻¹, línea discontinua). Las flechas indican la tasa máxima fotosintética para dichas concentraciones de CO₂ (Adaptado de Long 1991).

La temperatura de crecimiento modifica el óptimo de temperatura para la asimilación de CO₂, la liberación O₂ y el transporte electrónico fotosintético (Berry & Björkman 1980, Bunce 2000a, Yamasaki et al. 2002, Yamori et al. 2005), con cambios en la dependencia de la temperatura de la regeneración de RuBP y la carboxilación que deben ser tenidos en cuenta (Hikosaka et al. 1999, Bunce 2000a). Uno de los factores más importantes para explicar el incremento de la temperatura óptima de la fotosíntesis al aumentar la temperatura de crecimiento es un acrecentamiento de la energía de activación de V_{cmax} (Hikosaka et al. 2006). Más aún, la energía de activación de V_{cmax} presenta variaciones entre especies C₄ y C₃ de ambientes fríos y cálidos (Sage 2002).

En general, al aumentar la temperatura, los parámetros de la fotosíntesis como la velocidad máxima de carboxilación (V_{cmax}) y la velocidad máxima de transporte electrónico fotosintético (J_{max}) aumentan hasta un óptimo y a partir de él decrecen (Humphries & Long 1995, Bernacchi et al. 2001; Yamasaki et al. 2002), mientras que las características cinéticas de la Rubisco como la especificidad (τ) por el CO₂ respecto del O₂ (Long 1991) (Fig. 1.10) y – a temperaturas relativamente altas - la carbamilación (Crafts-Brandner & Salvucci 2000, Haldimann & Feller 2004, Sharkey 2005) disminuyen, de modo que al aumentar la temperatura aumenta la fotorrespiración (Long

1991, Bunce 1998). Por ello, el efecto favorable del aumento del CO₂ en la fotosíntesis se hará más evidente a temperatura alta (Fig. 1.9, Long 1991).

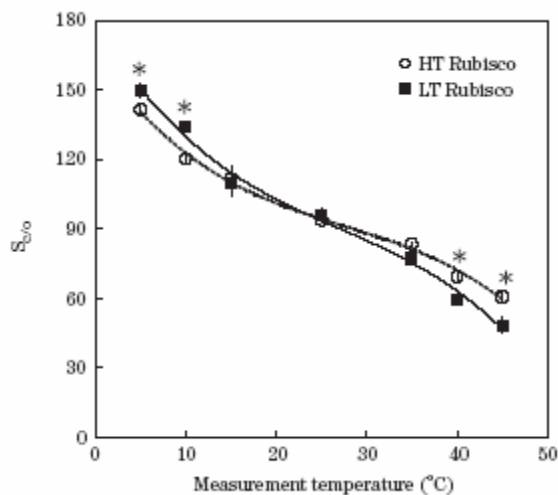


Fig 1.10. Dependencia de la temperatura del factor de especificidad ($S_{c/o}$). (Yamori et al. 2006).

1.6.3. Efecto interactivo del aumento del CO₂ y la temperatura

Los cambios atmosféricos tanto de temperatura como de CO₂ pueden tener un efecto interactivo mayor del esperado, ya que los modelos bioquímicos de la fotosíntesis han predicho que en plantas C₃ las respuestas de la asimilación de CO₂ a los incrementos de CO₂ a corto plazo son mayores a altas temperaturas (Long 1991). En un amplio rango de cultivos C₃ y de especies salvajes estudiadas, se observó un aumento significativo en la fotosíntesis y en la producción de materia seca en respuesta al aumento de CO₂ atmosférico entre 500 y 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. Estos incrementos fueron mayores cuando la temperatura era alta (Cure 1985, Idso 1989, Patterson & Flint 1990, Drake & Long 1991, Lawlor & Mitchell 1991).

Ciertos experimentos han mostrado que tanto la producción de materia seca como el rendimiento del grano de trigo se vieron incrementados con el aumento de la concentración de CO₂, pero se redujeron al aumentar la temperatura (Mitchell et al. 1995). Otros, en los que se utilizó trigo crecido en cámaras controladas en invernadero, o en cámaras descubiertas (Open top chamber, OTC) no se encontró interacción entre el CO₂ y la temperatura sobre las características fotosintéticas, el crecimiento o la

fenología del trigo (Delgado et al. 1994, Van Oijen et al. 1998). En contraste, tanto los modelos como la experimentación enseñaron que el efecto beneficioso que se produce al doblar la concentración de CO₂ sobre el rendimiento del grano de trigo se vio reducido e incluso anulado por el aumento de temperatura (Batts et al. 1998, Burkart et al. 2000, Laurila 2001, Assenga et al. 2004).

Se han encontrado aumentos en la catálisis de la Rubisco con temperatura o CO₂ elevados (Vu et al. 1997), como por ejemplo para V_{cmax} y J_{max} , cuya adaptación a largo plazo a la temperatura alteró el aumento de la fotosíntesis debido al CO₂ elevado (Ziska 2001). Para trigo y cebada crecidos en campo, se ha atribuido a cambios en τ una estimulación de la fotosíntesis mucho mayor de la esperada al doblar la concentración de CO₂ a temperaturas frías comparadas con especies crecidas a temperaturas calidas (Bunce 1998). Pero también se ha encontrado una inhibición de la actividad Rubisco activasa a temperatura alta que disminuye la activación del enzima (Feller et al. 1998; Law & Crafts-Brandner 1999). En cambio, en experimentos con adición alta de nitrógeno, la aclimatación negativa de la fotosíntesis al CO₂ elevado fue menor para las temperaturas más calidas en varios experimentos (Martínez-Carrasco et al. 2005).

Aunque no hay demasiada información sobre posibles mecanismos de regulación de la Rubisco en condiciones de interacción de temperatura y CO₂ (Morison & Lawlor 1999), aumenta la evidencia de que la temperatura a la que crecen las plantas modifica la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura y al CO₂ (Ziska 2001, Yamasaki et al. 2002).



OBJETIVOS

La unión de los aumentos de CO₂ y temperatura atmosféricos con el cambio climático reclama un mejor conocimiento de la respuesta de las plantas a la combinación de ambos factores. Sin embargo, en la amplia bibliografía sobre el efecto del aumento del CO₂, los estudios de su interacción con la temperatura creciente son relativamente escasos. Una razón de esta insuficiencia son los problemas en el diseño y ejecución de experimentos para valorar las interacciones del CO₂ con la temperatura, en parte por razones simplemente técnicas, de disponibilidad de recursos y necesidad de repetición en los mismos en aras de una fiabilidad estadística. El empleo de cámaras de gradiente de temperatura sobre cultivos de campo en este estudio es un intento de abordar estas interacciones en condiciones próximas a las naturales. El uso de cámaras de crecimiento en uno de los experimentos ha tenido el propósito de mejorar el conocimiento de ciertas respuestas disolviendo la usual asociación de las condiciones ambientales entre sí.

Aunque la conductancia de los estomas no suele imponer mayores limitaciones sobre la fotosíntesis en una atmósfera más rica en CO₂ que la actual, y se piensa que las adaptaciones a dicha atmósfera de estomas y fijación de CO₂ en el mesófilo están unidas, no se conoce bien si este enlace persiste cuando CO₂ y temperatura aumentan conjuntamente. En consecuencia, el primer objetivo de esta Tesis Doctoral es:

Conocer si las respuestas de la conductancia de los estomas y la fotosíntesis al CO₂ elevado se modifican por acción de la temperatura. En asociación con este objetivo, se ha examinado también si los estomas y la fotosíntesis se aclimatan al CO₂ elevado en paralelo o independientemente.

En plantas de trigo en el campo, en cámaras de gradiente de temperatura con el CO₂ y la temperatura actuales o más altos, se han analizado las respuestas directa (a corto plazo) y de aclimatación (largo plazo) de la conductancia de los estomas y la fotosíntesis al CO₂ y la temperatura, así como la relación entre ambos procesos.

Las consideraciones teóricas, basadas en las propiedades de la Rubisco, predicen una interacción del CO₂ y la temperatura sobre la respuesta de la fotosíntesis a esta última. Sin embargo, las respuestas a corto y a largo plazo a estos factores son muy distintas y escasamente investigadas. El efecto de la temperatura de crecimiento sobre

las respuestas a corto plazo de la fotosíntesis a la temperatura se ha estudiado, preferentemente, con plantas que crecen a temperatura constante. En el ambiente natural cambiante, este efecto puede ser diferente. Por otra parte, la influencia que puede tener, en la dependencia de la fotosíntesis respecto de la temperatura, el crecimiento prolongado en una atmósfera rica en CO₂, se desconoce en gran medida. En consecuencia, un segundo objetivo de esta Tesis es

Averiguar si la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura se modifica con el crecimiento en una atmósfera más cálida y rica en CO₂.

Este estudio se ha realizado, en primer lugar, con plantas de trigo cultivadas en condiciones de campo, dentro de cámaras de gradiente de temperatura, con concentraciones de CO₂ y temperaturas ambientales o aumentadas, plantas que experimentan las fluctuaciones naturales diarias y estacionales de la temperatura. Aquí se ha analizado el intercambio gaseoso y la velocidad de carboxilación limitada por Rubisco en las hojas a varias temperaturas. Seguidamente, el estudio se ha completado con plantas cultivadas en cámara de crecimiento en CO₂ ambiental o elevado, para determinar la respuesta a la temperatura de los parámetros del modelo de la fotosíntesis propuesto por Farquhar.



MATERIAL Y METODOS

3.1. Material Vegetal

El material vegetal utilizado en todos los experimentos realizados en este trabajo fue el trigo, *Triticum aestivum* L., tanto para los experimentos realizados en campo como para los llevados a cabo en cámara de crecimiento. De igual manera, todo el material vegetal utilizado en la experimentación en laboratorio provino de dicha especie vegetal y de dichas condiciones de experimentación.

3.1.1. Especie vegetal utilizada: *Triticum aestivum* L.

El *Triticum aestivum* L., es una planta monocotiledónea, que pertenece a la familia de las Gramíneas o Poáceas, genero *Triticum*. Originaria de Oriente Medio, su cultivo esta actualmente extendido por todo el mundo debido a la utilización del grano en la alimentación humana.

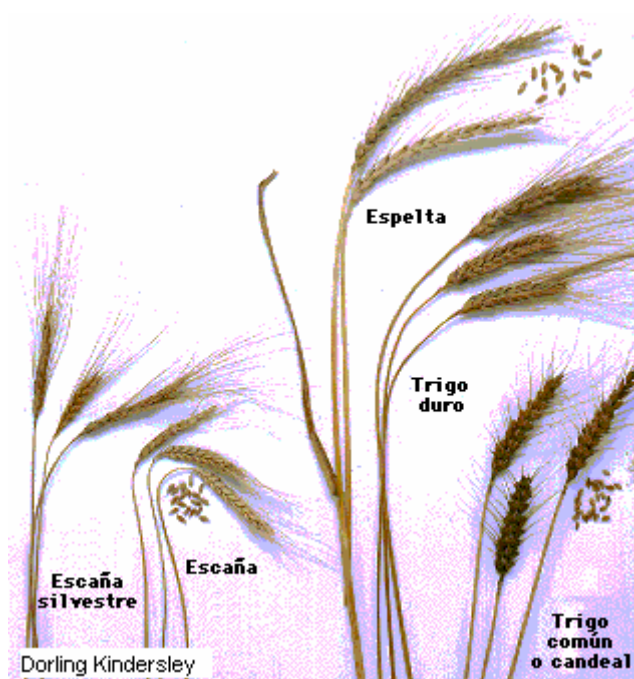


Fig 3.1. Distintas especies de trigo

Es una planta herbácea, con raíz fasciculada poco desarrollada. Sus hojas son bastante largas, cintiformes, con nervios paralelos y terminadas en punta. La hoja está envainando al tallo de una forma característica; en el punto en el que el limbo se separa

del tallo, en el vértice de la parte envainadora de la hoja, se encuentran dos estípulas cubiertas de fino vello y una lígula transparente aplicada sobre el tallo.

La espiga esta formada por un tallo o eje macizo llamado raquis, sinuoso y estrangulado a intervalos regulares, sobre el que se encuentran unidas directamente y de forma alternativa a derecha e izquierda, las espiguillas. Las espiguillas son numerosas y se recubren apretadamente unas a otras, cada una contiene varias flores más o menos completamente desarrolladas. La flor es muy pequeña y desprovista de atractivo visual. Tras la fecundación, cada flor da lugar a un único fruto, la cariósipide o grano, que lleva un embrión junto a las sustancias de reserva.



Fig 3.2. Espigas y grano de *Triticum aestivum* L.

3.1.2. Variedades de *Triticum aestivum* L. utilizadas

Todos los experimentos realizados se llevaron a cabo con la variedad de trigo de primavera (*Triticum aestivum* L.) Alcalá. Esta variedad tiene gran ahijamiento y un ciclo largo y tardío de espigado. Su espiga es larga y aristada, y el grano de buena

calidad harino-panadera. Es rustico, resistente a la sequía y al frío. Tiene una productividad baja-media, es algo sensible al encamado, resistente al desgrane y a la roya amarilla pero poco sensible a la parda y sensible a la negra, resistente al carbón desnudo y poco sensible a la caries o tizón. Es apropiado para terrenos de mediana fertilidad, en comarcas con fríos apreciables. Bueno para su cultivo en las zonas trigueras de las dos Castillas.

3.2. Condiciones de cultivo y diseños experimentales

Se realizaron dos experimentos de campo, ambos en los años 2002 y 2003, utilizando los mismos cultivos. Uno se encaminó a investigar la aclimatación de los estomas y la fotosíntesis al CO₂ y la temperatura de crecimiento, y el segundo a investigar el efecto de las condiciones de crecimiento en la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura. Se realizó también un experimento con macetas en cámara de crecimiento durante el invierno del 2003-2004, para explorar más ampliamente el efecto del crecimiento en CO₂ elevado en la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura.

3.2.1. Experimentos de campo

Los experimentos se realizaron en la finca experimental Muñovela del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA) (40.95° N 5.50° W, 800 m sobre el nivel del mar, aprox.) durante los meses de febrero (fecha de la siembra) a julio (recogida de la cosecha final). El suelo de la zona es de tipo areno-arcilloso. El clima, es de tipo mediterráneo, con una temperatura mínima media (20 años) de 0 °C durante el mes más frío (Enero) y una máxima de 27.2 °C durante el mes más caluroso (Julio). La precipitación media anual es de 506 mm.

El trigo se sembró en hileras de unos 13.6 cm de separación dando una densidad de siembra de unos 185 a 190 kg ha⁻¹. En el 2002 se abonó con 60 kg ha⁻¹ de P y K y 52 kg ha⁻¹ de N (en forma de Nitrato amónico) antes de la siembra. En el 2003, se sembró primero un cultivo de *Brassica napus* y no se fertilizó el suelo antes de la siembra del trigo. Posteriormente, se establecieron dos niveles de suministro de nitrógeno mediante la adición de 70 kg ha⁻¹ en parte del cultivo el 2 y el 30 de Abril de 2002 y 2003,

respectivamente. El nutriente en solución se aplicó cuidadosamente a mano para evitar salpicaduras. El cultivo se regó semanalmente con un sistema de goteo que aportó 198 mm entre Febrero y Junio, igualando el promedio de lluvia en la zona en el periodo del experimento.

3.2.1.1. Cámaras de gradiente de temperatura (CGT)

Tras la emergencia del cultivo, se colocaron cámaras de gradiente de temperatura (CGT) sobre el mismo (Fig. 3.3). Las CGT fueron adaptadas a partir del modelo descrito por Rawson et al. (1995). Son transportables y contienen en su interior sondas, sensores y parte del equipamiento de control. Son de plástico transparente, con una estructura cerrada en forma de caja hecha de aluminio, con 9.6 m de longitud (incluido un compartimento de salida de 0.6 m), 2.2 m de ancho y 1.7 m de altura en el centro.



Fig 3.3. Imagen de uno de los CGTs utilizado en el experimento.

Tienen un diseño modular. Los módulos (3 m de longitud cada uno) de las tres temperaturas, están atornillados consecutivamente y separados por láminas discontinuas transparentes (Fig. 3.4). Las laminas, de unos 15 cm, tienen una separación entre ellas de 10 cm y su función es la de reducir la mezcla de aire entre los módulos por convección. Para el techo se utilizó un plástico de polietileno estable al ultravioleta. Este material posee buena transmisión tanto de la radiación fotosintéticamente activa como de la radiación ultravioleta, imitando así las condiciones externas. Las paredes y las láminas entre cada módulo, se hicieron de policarbonato rígido, que filtra la radiación UV. Las paredes rígidas previenen el efecto de ráfagas de aire que puedan afectar al gradiente de temperatura. El diseño incluye puertas en las paredes longitudinales (Fig. 3.4) para poder acceder a las plantas que hay en el interior. Las CGTs fueron unidas a tablonces de madera anclados al suelo.

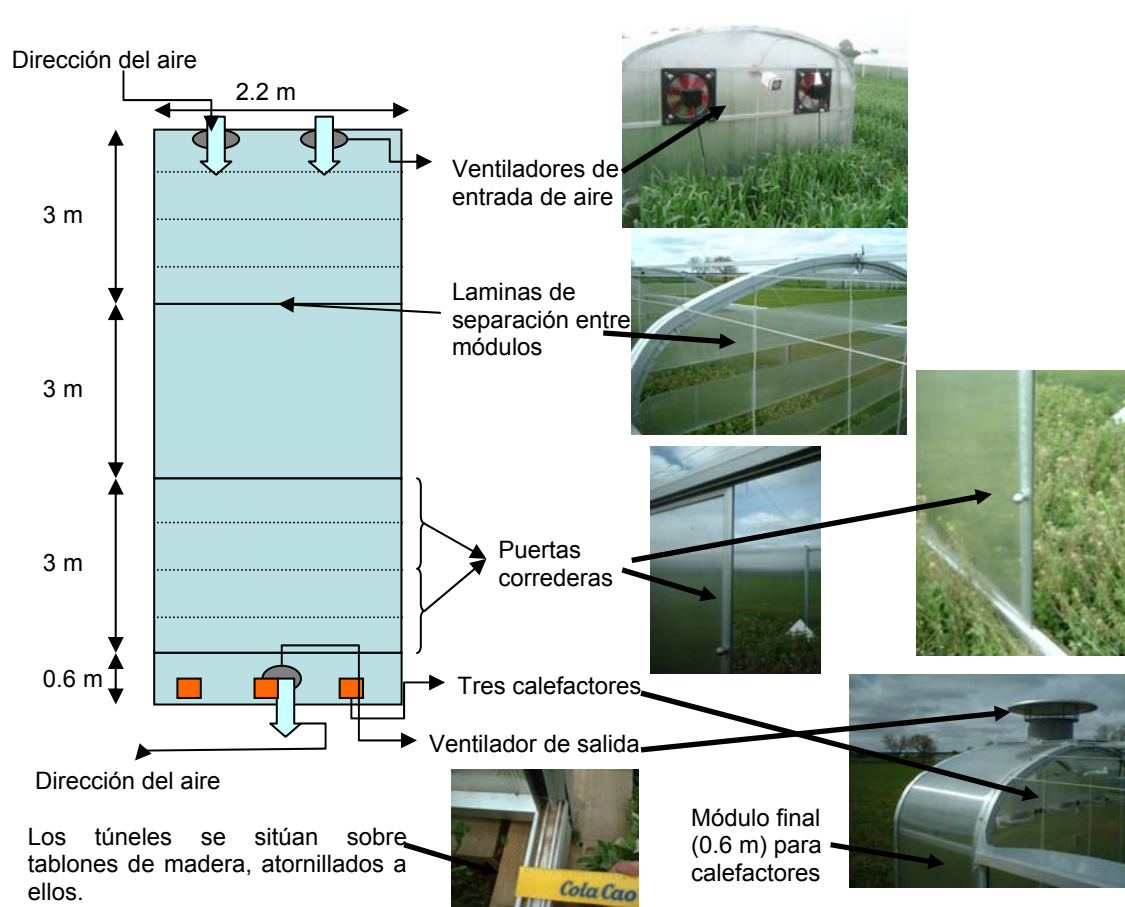


Fig 3.4. Esquema e imágenes de una de las CGTs utilizadas, con los tres módulos y distintos componentes. Las áreas consecutivas de muestreo están señaladas con líneas punteadas.

Se montaron dos ventiladores (90 Watt, $0.5 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, modelo S&P HCBB/4-315-HG Extractor) de entrada de aire en los módulos iniciales, por encima de la altura de las plantas, y un ventilador de salida (140 Watt, $0.54 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, modelo HCIB/4-315-B Extractor tejado) en el techo del módulo final, para que el aire circule de forma continua a través del túnel a la velocidad requerida para mantener una diferencia de temperatura entre los dos módulos extremos. El ventilador colocado en el módulo final está en realidad en el techo del compartimento de salida, así el viento de fuera no perturba el gradiente de temperatura (Rawson et al. 1995). El flujo de aire, está en continua variación debido a cambios en la velocidad de los ventiladores para lograr la diferencia de temperatura deseada entre los módulos de entrada y salida (Fig. 3.4). A velocidad máxima el aire dentro de la cámara cambia en menos de 1 minuto. La velocidad mínima de los ventiladores se fijó en un 40% de la velocidad máxima. Para ayudar a mantener la

diferencia de temperatura durante la noche y cuando la radiación solar era insuficiente para ello, se colocaron tres calefactores pequeños (250-500 W) con ventilador por encima del nivel de las plantas, en el compartimento de salida, mirando hacia el interior de la cámara (Fig. 3.4).

Para el control de la operación de los ventiladores y los calefactores, los termopares del diseño original (Rawson et al. 1995) fueron sustituidos por dos sondas Pt-100 una de las cuales se colocó fuera de la cámara, cercana a los ventiladores de entrada para aproximar lo máximo posible la temperatura del módulo inicial a la temperatura del exterior. La segunda sonda se colocó en el centro del módulo de salida y un comparador de ambas sondas se conectó a un controlador proporcional, integrador y derivador (PID) que enviaba señales a los ventiladores y calefactores. Las sondas de temperatura se protegieron de la radiación directa del sol y se ventilaron. La diferencia de temperatura medida se usó para ajustar la velocidad requerida de los ventiladores: el gradiente de temperatura dentro de la cámara disminuye o aumenta cuando los ventiladores giran más rápido o más lento, respectivamente. En vez de accionar los calefactores mediante un temporizador (Rawson et al. 1995), las dos sondas Pt-100 controlan el tiempo de operación de los calefactores desde 0% a 100% en ciclos de 15 segundos, con un tiempo más amplio para el incremento del gradiente de temperatura.



Fig 3.5. Sonda de aire y sensor de humedad y temperatura dentro del módulo inicial o de entrada (imagen A). Electroválvula y salida de CO₂ dentro del CGT (imagen B).

La concentración de CO₂ dentro de las cámaras es continuamente monitorizada en el módulo de salida mediante un analizador de gases por infrarrojo cuya señal llega a

otro PID, el cual controla en ciclos de 10 segundos el tiempo de apertura de una electroválvula que inyecta CO₂ cerca de los dos ventiladores de entrada (Fig. 3.5B), para que la mezcla lateral de CO₂ en las cámaras sea completa. Se colocaron en el centro de cada módulo a 60 cm sobre las plantas, unos sensores de humedad y temperatura (HMD50, Vaisala, Helsinki, Finlandia) además de sondas de aire conectadas a otro analizador de gases por infrarrojo (Fig 3.5A). Para registrar la cantidad de radiación fotosintéticamente activa (PAR) se colocaron dentro y encima de cada túnel unos sensores de luz (LI-190SB, LI-COR, NE, USA).

Los datos se guardaron de forma continua en un ordenador mediante convertidores analógico-digitales (Microlink 751, Biodata Ltd, Manchester, UK) y utilizando el software Windmill con la herramienta de programación Test-Seq (Biodata Ltd). Una de las subrutinas de este software controla unas electroválvulas que mantienen abierto o cerrando uno de los dos grupos de botellas de CO₂ que suministran el gas a las cámaras de CO₂ elevado. Cuando la concentración de CO₂ desciende por debajo del nivel fijado, indicando que uno de los grupos de botellas está agotado, la válvula correspondiente se cierra mientras que la del otro grupo de botellas se abre.

Después de la realización del experimento, todo el equipamiento de monitorización y la instalación eléctrica se desinstalan y las CGTs se anclan al suelo y se almacenan en el campo hasta el siguiente experimento.

3.2.2. Experimento en cámara de crecimiento

El experimento se realizó en 2003-2004 en una cámara de crecimiento (Koxka, Pamplona) en macetas con perlita. La cámara, una estancia con 3.58 m de largo, 4.78 m de ancho y 2.35 m de alto tiene en su interior dos mesas (2.45 x 1.70 m) sobre las que se colocaron las macetas (Fig. 3.6.). El juego de lámparas de la cámara está compuesto por luces fluorescentes e incandescentes y es regulable en altura de forma que se pueda ajustar la irradiancia deseada, en este caso una densidad de flujo fotónico de 300-350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El fotoperíodo establecido en la cámara fue de 14 h, desde las 7:00 a las 21:00 horas. Y la temperatura fue de 20 °C durante la luz y de 10 °C cuando ésta no estaba encendida. La humedad relativa de la cámara se ajustó al 60%. Mediante una sonda de temperatura y humedad, se registraron en un ordenador los posibles cambios

producidos en la temperatura y la humedad de la cámara. Se utilizó una misma cámara para dos cultivos sucesivos, con objeto de disminuir las diferencias debidas a condiciones de la cámara. En uno de los cultivos, se inyectó CO₂ puro junto a los ventiladores interiores de la cámara, para facilitar la mezcla con el aire.

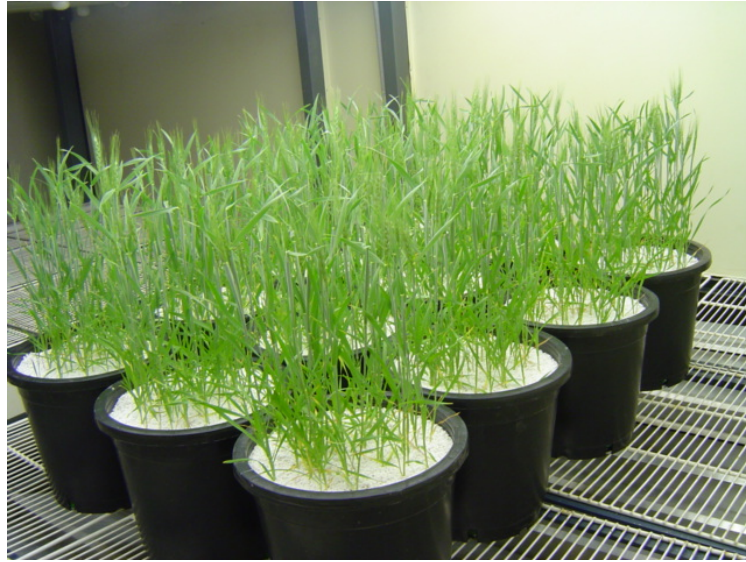


Fig 3.6. Macetas dentro de la cámara de crecimiento.

La inyección de CO₂ se reguló mediante un analizador de gases por infrarrojo conectado a una electroválvula a través de un PID, de forma similar al experimento de campo. Se sembraron 12 macetas de 16 l con 35 semillas cada una para cada experimento, uno llevado a cabo en CO₂ ambiente y otro en 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂. A las macetas se les administró agua y una solución nutritiva (Israel et al. 1990) completada con micronutrientes (Hewitt 1966) en cantidad suficiente:

<u>Sal</u>	<u>mM (final)</u>
Ca Cl ₂	4.0
Mg SO ₄ ·7H ₂ O	1.5
Na ₂ H PO ₄ ·12 H ₂ O	0.399
H ₂ NaPO ₄ ·2 H ₂ O	0.936
Fe·Citrato 3H ₂ O	0.1
Mn SO ₄ ·H ₂ O	0.5
Cu SO ₄ ·5H ₂ O	0.1
Zn SO ₄ ·7H ₂ O	0.1
H ₃ BO ₃	5.0
NaCl	10.0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.05
K NO ₃	10.1

3.2.3. Diseños experimentales

Los dos cultivos de campo compararon todas las combinaciones de dos concentraciones de CO₂ en el aire (ambiente y 700 μmol mol⁻¹ de CO₂), dos temperaturas (ambiente y ambiente + 4 °C) y dos niveles de nitrógeno, cada uno añadido a una de las dos mitades longitudinales de las cámaras (52 y 122 kg ha⁻¹ en 2002 y nada y 70 kg ha⁻¹, en adición más tardía, en 2003). Los experimentos tuvieron un diseño anidado, con temperaturas y dosis de nitrógeno incluidas dentro del tratamiento de CO₂.

El experimento en cámara de crecimiento comparó dos concentraciones de CO₂ (ambiente y 700 μmol mol⁻¹ de CO₂) con un diseño sin bloques.

Todas las medidas y muestras se repitieron cuatro (experimentos de campo) o seis veces (experimento en cámara de crecimiento).

3.3. Determinaciones experimentales

3.3.1. Toma de muestras y conservación

Se tomaron muestras de la última hoja completamente desarrollada directamente en el campo. Las muestras se recogieron en la emergencia de la espiga (20-22 Mayo en 2002; 21-23 Mayo en 2003) y la antesis (03-06 Junio en 2002; 04-06 Junio en 2003), para las medidas de clorofila empleadas en el estudio de la aclimatación de la conductancia y la fotosíntesis. Se tomaron muestras adicionales entre ambas fases para el estudio de la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura. Se cortó la hoja completa y se congeló al instante en nitrógeno líquido. Con el fin de tener muestras de tamaño y representatividad suficiente, de cada repetición correspondiente a un tratamiento se cortaron cuatro (experimentos de campo) o seis (experimento de cámara de crecimiento) hojas y se almacenaron juntas. Las muestras se trasladaron desde el campo o la cámara al laboratorio en nitrógeno líquido y se conservaron debidamente etiquetadas y clasificadas en congeladores a -80°C .

3.3.2. Medida de la fotosíntesis

Se utilizó un analizador de gases de infrarrojo (IRGA) CIRAS-2 (PP SYSTEMS, Hitchin, Herts., UK) con operación diferencial y circuito de aire abierto. Con este aparato, se pueden obtener parámetros como la asimilación neta de CO_2 (A), la transpiración (E), la concentración intercelular de CO_2 (Ci), la conductancia estomática (g) (para CO_2 y H_2O) y la temperatura de la hoja. Excepto cuando se indiquen otros valores, las medidas se realizaron en 1.7 cm^2 de superficie de la zona central de últimas hojas, con un flujo de aire de 300 ml min^{-1} , una temperatura de 25°C , un déficit de presión de vapor de $1.6 \pm 0.23\text{ kPa}$, y una densidad de flujo fotónico de $1500\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. La temperatura se controló con el sistema Peltier del propio analizador.

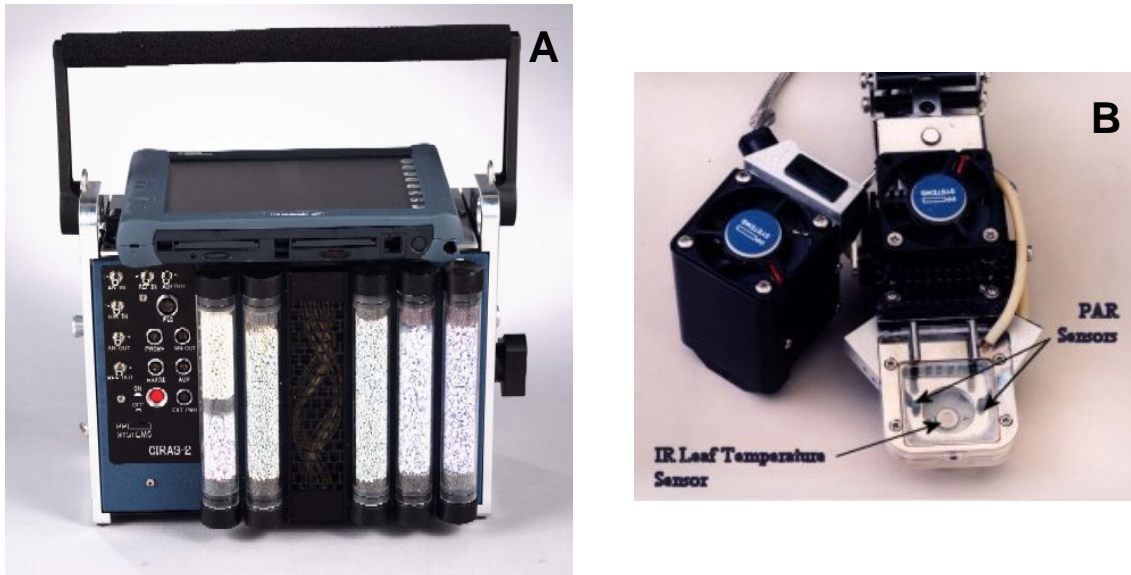


Fig 3.7. Imagen del IRGA Ciras 2 (A) y detalle de la cámara foliar que lleva adaptada para la medida en hojas *in vivo* (B). (<http://www.ppsystems.com>)

Recientemente, varias publicaciones han puesto de relieve que el intercambio gaseoso entre las cámaras foliares de los analizadores de CO_2 y el aire circundante puede conducir a estimaciones erróneas de la fotosíntesis y la concentración intercelular de CO_2 (Jahnke & Krewitt 2002; Pons & Welschen 2002; Long & Bernacchi 2003; Flexas et al. 2007b; Rodeghiero et al. 2007). La comparación entre plantas con hojas homobáricas y heterobáricas muestra que la fuga de gas entre las superficies de las juntas de la cámara foliar es mucho mayor que las posibles fugas a través del mesófilo (Flexas et al. 2007b). En consecuencia, en el experimento en cámaras de crecimiento las estimaciones de A y C_i se corrigieron respecto a las fugas determinadas utilizando una hoja fotosintéticamente inactiva, como describen Flexas et al. (2007b). Así, se obtuvo una hoja muerta mediante inmersión en agua hirviendo, después se secó con papel de filtro y se introdujo en la cámara foliar. La fotosíntesis y la transpiración aparentes se midieron con el mismo protocolo utilizado para obtener las curvas A/C_i (véase más abajo). Las hojas parcialmente húmedas tuvieron una transpiración aparente significativa, como cabe esperar (Fig. 3.8A); sin embargo, cuando la hoja muerta estaba seca, la fuga de vapor de agua (Fig. 3.8B) fue pequeña, a diferencia con lo observado por Rodeghiero et al. (2007), y sin consecuencias para las determinaciones de A y C_i . Por consiguiente, no se han hecho correcciones de la difusión del agua. La difusión de CO_2 a través de las juntas de la cámara foliar dependió de la concentración de CO_2 en el aire y del orden en el que se cambió ésta durante las medidas (véase abajo). Así, al

disminuir el CO₂ desde 115 hasta 12 μmol mol⁻¹ de CO₂, la difusión de CO₂ al interior de la cámara disminuyó progresivamente (Fig. 3.8C, recuadro pequeño), y al aumentar la concentración de 360 a 1800 μmol mol⁻¹ de CO₂ la difusión al exterior aumentó (Fig. 3.8C). Los escapes produjeron velocidades de intercambio aparente de CO₂ de -0.96 (con 115 μmol mol⁻¹ de CO₂) a 1.8 μmol m⁻² s⁻¹ (con 1800 μmol mol⁻¹ de CO₂). El intercambio gaseoso de las hojas vivas se corrigió sustrayendo las regresiones de la fotosíntesis aparente frente a la concentración de CO₂ del aire. Los valores de C_i se recalcularon utilizando las fórmulas del fabricante del analizador (Flexas et al. 2007b).

A partir de las curvas A/C_i corregidas, en el experimento en la cámara de crecimiento se estimó la concentración de CO₂ en el cloroplasto ($C_c = C_i - A/g_m$), utilizando la conductancia del mesofilo (g_m) determinada mediante ajuste no lineal de las ecuaciones 3.1 y 3.6 (véase abajo), hallando los mínimos de las sumas de desviaciones al cuadrado. Para ello se ha utilizado un procedimiento recientemente publicado (Sharkey et al. 2007; <http://www.blackwellpublishing.com/plantsci/pcecalculation/>). Aunque g_m disminuye en CO₂ alto, se ha demostrado que esta disminución tiene efectos despreciables en la estimación, detallada más abajo, de las velocidades máximas de carboxilación y transporte fotosintético de electrones. (Flexas et al. 2007a).

En los experimentos de campo, se realizaron varios tipos de medidas de la fotosíntesis en la última hoja totalmente desarrollada, entre la emergencia de la espiga (20-22 Mayo en 2002; 21-23 Mayo en 2003) y la antesis, (3-6 Junio en 2002; 4-6 Junio en 2003), de 3 a 8 h después del comienzo del fotoperiodo. Para el estudio de la aclimatación de la conductancia de los estomas y la fotosíntesis, se efectuaron medidas con concentraciones de CO₂ de 370 y 700 μmol mol⁻¹ de CO₂ en estas dos fechas. Para otros estudios se emplearon varias concentraciones de CO₂, como se detalla más abajo. Las medidas se realizaron, en el campo, en cuatro hojas elegidas al azar en áreas consecutivas de cada combinación de CO₂ y temperatura. Se midió una hoja de cada tratamiento, con los tratamientos dispuestos al azar, antes de la hoja siguiente, de forma que las diferencias durante el día se absorbiesen en las hojas repetidas. En la cámara de crecimiento se hicieron medidas en seis hojas de distinta maceta cada una, de cada concentración de CO₂.

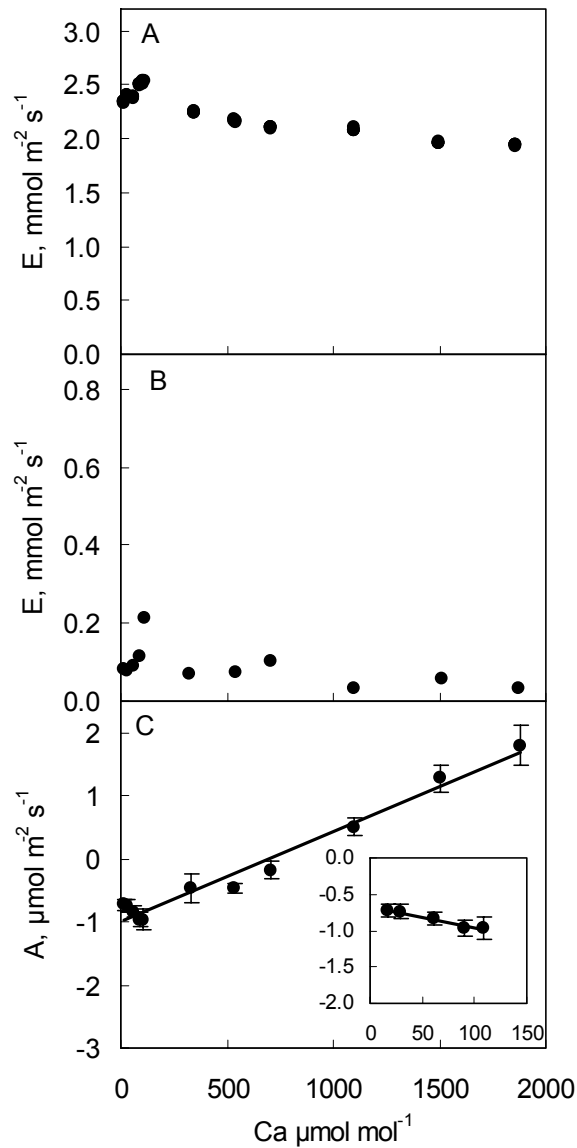


Fig 3.8. Respuesta de las fugas de vapor de agua (A, B) y CO_2 (C) a la concentración de CO_2 en el aire (Ca) en una cámara foliar que contiene una hoja muerta por tratamiento térmico. La hoja estaba parcialmente húmeda en (A) y completamente seca en (B).

3.3.2.1. Curvas de respuesta a la temperatura

Estas curvas se determinaron para observar cómo modifican las condiciones de temperatura y CO_2 de crecimiento la dependencia de la fotosíntesis respecto a la temperatura. Las temperaturas empleadas fueron: 15, 20, 25, 30 y 35 °C. En el experimento de campo de 2002, las concentraciones de CO_2 utilizadas en cada una de las temperaturas de medida fueron 200 y 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, con las cuales, en luz

saturante, la fotosíntesis suele estar limitada por la capacidad de carboxilación de la Rubisco y por la capacidad de regeneración de Ribulosa-1,5-bisfosfato, respectivamente. En el campo en 2003 y en la cámara de crecimiento se emplearon, en cada temperatura, las concentraciones de CO₂ detalladas en el apartado 3.3.2.3.

3.3.2.2. Respuesta inicial al CO₂ en dos intensidades de luz

En el experimento en cámara de crecimiento se midieron las respuestas A/Ci para valores bajos de Ci (115, 90, 60, 24 y 12 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) a dos intensidades de luz, 200 y 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se realizaron estas medidas para calcular el punto de compensación para el CO₂ (Γ^*) en ausencia de respiración mitocondrial, y para calcular la respiración mitocondrial en la luz (R_d), siguiendo el procedimiento de Laisk (1977). A diferencia de R_d , la fotorrespiración depende en gran medida de la intensidad luminosa; por lo tanto, el punto de intersección de las respuestas A/Ci (que son lineales en el margen de concentraciones de CO₂ elegido) para las dos intensidades luminosas representa Γ^* y R_d cuando se extrapola a los ejes x (Ci) e y (A), respectivamente. Este punto de compensación es un indicador de la especificidad de la Rubisco por el CO₂ respecto del O₂ (Ecs.1-3 a 1-5).

3.3.2.3. Curvas de respuesta al CO₂ (curvas A/Ci)

Con estas curvas se obtuvieron dos parámetros del modelo de fotosíntesis de Farquhar et al. (1980), la velocidad máxima de carboxilación del enzima Rubisco (V_{cmax}) – en el campo en 2003 y en la cámara de crecimiento - y la velocidad máxima de transporte electrónico con luz saturante (J_{max}) – en la cámara de crecimiento -. Para cada temperatura de medida, las concentraciones de CO₂ en el aire introducido en la cámara foliar fueron de 60, 150, 250 y 360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ en 2003, y 115, 90, 60, 24, 12, 370, 550, 700, 1100, 1500 y 1800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, por este orden, en la cámara de crecimiento, permitiendo un tiempo de estabilización de unos 5 min en cada una antes de registrar las medidas. V_{cmax} y J_{max} a cada temperatura de medida se calcularon de acuerdo con Farquhar et al. (1980):

La asimilación de CO₂ limitada por la actividad Rubisco, de acuerdo con las Ecs. 1-6 y 1-7 es:

$$A = V_{c\max} \cdot \frac{(C_n - \Gamma^*)}{(C_n + K_c(1 + \frac{O}{K_o}))} - R_d \quad \text{Ec. 3.1}$$

donde C_n es C_i en el experimento de campo de 2003 y C_c en el experimento en cámara de crecimiento.

Substituyendo (C_n - Γ*) / (C_n + K_c(1 + O/K_o)) por *f* en la Ec. 3.1:

$$A = V_{c\max} \cdot f - R_d \quad \text{Ec. 3.2}$$

V_{cmax} y R_d se resolvieron (Long & Bernacchi 2003), a cada temperatura de medida, como una función lineal de *f*. En el campo en 2003 los valores de Γ* K_c y K_o y los parámetros que describen su dependencia respecto a la temperatura se tomaron de Bernacchi et al. (2001):

$$K_c = 404.9 \exp(79.43 \frac{T_k - 298}{(R \cdot 298 \cdot T_k)}) \quad \text{Ec. 3.3}$$

$$K_o = 278.4 \exp(36.38 \frac{T_k - 298}{(R \cdot 298 \cdot T_k)}) \quad \text{Ec. 3.4}$$

$$\Gamma^* = 42.75 \exp(37.83 \frac{T_k - 298}{(R \cdot 298 \cdot T_k)}) \quad \text{Ec. 3.5}$$

donde R es la constante molar de los gases (8.314 J mol⁻¹ K⁻¹) y T_k la temperatura absoluta de la hoja. En el experimento en cámara de crecimiento Γ* y R_d a cada temperatura de medida se estimaron directamente como se indica en 3.3.2.2.

En el experimento en cámara de crecimiento, a partir de la curva de respuesta A/C_c a cada temperatura de medida, se estimó la velocidad de fotosíntesis limitada por la regeneración de RuBP de acuerdo con las Ecs. 1.5, 1.6 y 1.13:

$$A = \left(1 - \frac{\Gamma^*}{C_c}\right) \frac{J C_c}{4.5 C_c + 10.5 \Gamma^*} - R_d \quad \text{Ec. 3.6}$$

La velocidad de transporte de electrones, J , se relaciona con la irradiancia absorbida Q_2 :

$$\theta J^2 - (Q_2 + J_{\max})J + Q_2 J_{\max} = 0 \quad \text{Ec. 3.7}$$

con solución para J :

$$J = \frac{Q_2 + J_{\max} - \sqrt{(Q_2 + J_{\max})^2 - 4\theta Q_2 J_{\max}}}{2\theta} \quad \text{Ec. 3.8}$$

donde θ es la curvatura de la respuesta a la luz y J_{\max} la velocidad máxima de transporte de electrones. Q_2 se relaciona con la irradiancia incidente, Q :

$$Q_2 = \frac{Q \cdot abs \cdot (1 - F)}{2} \quad \text{Ec. 3.9}$$

donde *abs* es la absorbancia de las hojas (se supone que es 0.8) y F (que se supone igual a 0.25) es una corrección de la calidad espectral de la luz (von Caemmerer, 2000).

La velocidad de fotosíntesis saturada por la luz y el CO_2 , A_{\max} , se calculó ajustando una hipérbola rectangular con el programa Photosynthesis Assistant (<http://www.scientific.force9.ac.uk>):

$$A = \frac{EC \cdot C_c \cdot A_{\max}}{EC \cdot C_c + A_{\max}} - R \quad \text{Ec. 3.10}$$

Donde EC es la eficiencia de la carboxilación y R la respiración (en luz y oscuridad). A_{\max} se utilizó para determinar J_{\max} reordenando la Ec. 3.6:

$$J_{\max} = \frac{(A_{\max} + R_d) \cdot (4.5C_c + 10.5\Gamma^*)}{C_c - \Gamma^*} \quad \text{Ec. 3.11}$$

Las respuestas a la temperatura de los parámetros del modelo de la fotosíntesis obtenidos *in vivo* se normalizaron a una temperatura de referencia de 25 °C y se ajustaron a una función de Arrhenius (von Caemmerer 2000; Medlyn et al. 2002):

$$\text{Ln Parámetro} = \text{Ln Parámetro}_{25} + H \frac{T_k - 298}{(R \cdot 298 \cdot T_k)} \quad \text{Ec. 3.12}$$

donde Parámetro₂₅ es el valor a 25 °C y H es la energía de activación.

3.3.2.4. Curva de respuesta a la luz

Con ella se obtiene, por un procedimiento alternativo, A_{\max} sustituyendo J y J_{\max} por A y A_{\max} , respectivamente, en la Ec. 3.8. A partir del valor de A_{\max} así obtenido se determinó J_{\max} (Ec. 3.11), en el experimento en cámara de crecimiento, las intensidades de luz utilizadas para esta curva fueron: 1500, 1200, 800, 500, 300, 200, 140, 80 y 3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La concentración de CO_2 en el aire durante las medidas fue de 1800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$.

3.3.3. Análisis de actividad Rubisco a diferentes temperaturas

Para el ensayo *in vitro* de la actividad Rubisco, en el experimento de campo de 2002, se empleó el método descrito primeramente por Lilley & Walker (1974) y modificado por Sharkey et al. (1991). En este ensayo se realiza una cascada de reacciones (Fig. 3.9), una de las cuales se acopla a la oxidación de NADH, midiéndose la disminución de absorbancia a 340 nm menos 400 nm en un espectrofotómetro, con un coeficiente de extinción molar de 6,22.

La reacción catalizada por la fosfoglicerato kinasa es muy dependiente de la concentración de ADP, que es un inhibidor. Para que no sea limitante del flujo global, se mantiene un balance ATP/ADP alto mediante la reacción catalizada por creatina kinasa (Fig. 3.9). La reacción es lineal durante 30-60 s. Y la pendiente de esta línea es proporcional a la actividad del enzima, teniendo en cuenta que la estequiometría entre

oxidación de NADH y carboxilación de RuBP es 2:1, por lo que la velocidad de carboxilación será la mitad de la de oxidación de NADH.

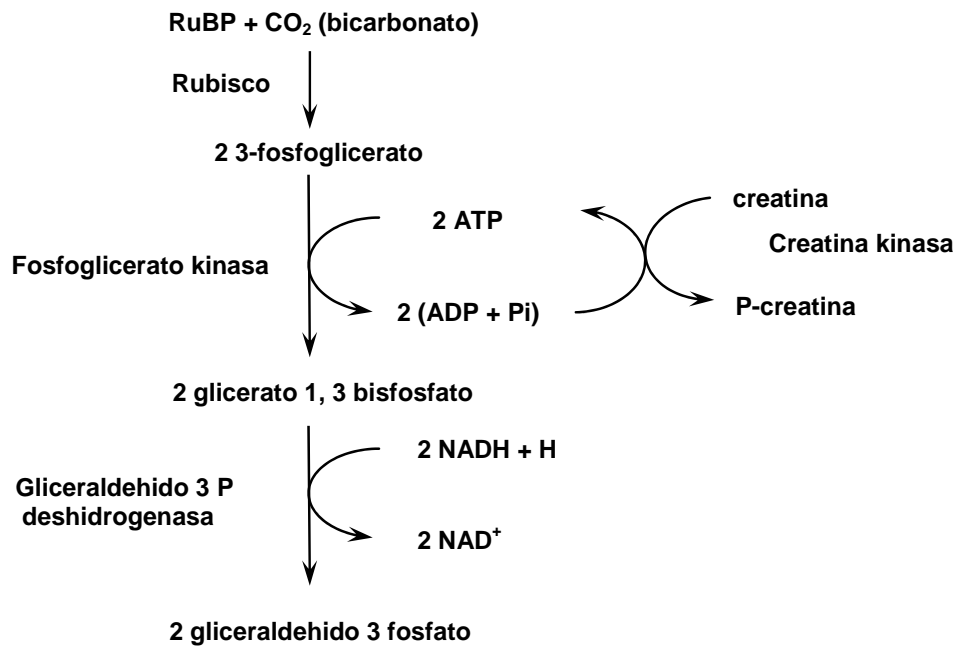


Fig 3.9. Esquema de la cascada de reacciones mediante la cual se realiza el análisis de actividad Rubisco *in vitro*.

Para estimar la actividad Rubisco por unidad de superficie foliar, una alícuota de las muestras congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a -80°C se fotografió con una cámara digital, determinándose su superficie mediante análisis de imagen. A continuación se determinó su contenido en clorofila en extracto de acetona midiendo la absorbancia a 663 y 645 nm a partir de la ecuación (Arnon 1949):

$$\text{Clorofila total (mg l}^{-1}\text{)} = (8,05 \times A_{663}) + (20,29 \times A_{645}) \quad \text{Ec. 3.13}$$

Con las muestras congeladas se realizó una extracción en mortero congelado con el tampón adecuado:

Tampón de extracción:

- Bicina-NaOH 100 mM (pH 7.8)
- MgCl₂ 10 mM
- Mercaptoetanol 10 mM
- PVPP insoluble 2 % (peso: volumen)

- BSA + Triton X-100 1.1 mg/ml

Una alícuota del extracto se usó para medir el contenido de clorofila. El resto del extracto se centrifugó a 13000 g durante 30 s y con una alícuota (20 μ l) de dicho extracto centrifugado se realizó una medida de actividad Rubisco inicial a temperatura ambiente. El tiempo total desde la extracción hasta la medida de la actividad Rubisco inicial fue de menos de 2.5 min. Para realizar este análisis se añadió al extracto un cóctel que contenía todos los compuestos necesarios para llevar a cabo la reacción en cadena para medir la actividad. Los enzimas comerciales suspendidos en sulfato amónico se precipitaron por centrifugación y se disolvieron en glicerol al 20 % (Sharkey et al. 1991).

Cóctel de Análisis:

- Bicina-NaOH 100 mM (pH 8.2)
- MgCl₂ 20 mM
- KCl 10 mM
- ATP 5 mM
- NaHCO₃ 30 mM
- Creatina fosfato 5 mM
- Creatina kinasa 52 unidades/ml (u/ml)
- Fosfoglicerato kinasa (PGK) 12 u/ml
- Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (GAPD) 11 u/ml
- NADH 0.2mM
- RuBP 1mM

El resto del extracto vegetal se conservó en hielo para realizar las medidas de actividad total. Estas medidas se realizaron a distintas temperaturas (15, 20, 25, 30 y 35°C) y se comprobó que la actividad Rubisco no cambiaba durante el tiempo transcurrido desde la extracción de la hoja hasta el último de los cinco ensayos dependientes de la temperatura.

Previo a la determinación de la actividad Rubisco total se realizó la incubación del extracto foliar con Mg y bicarbonato durante 10 minutos a temperatura ambiente, mientras que el resto del cóctel de incubación se ajustó a cada temperatura de medida (15, 20, 25, 30 o 35 °C) durante el mismo tiempo en baños termostatzados.

Cóctel de incubación:

- Bicina-NaOH 100 mM (pH 8.2)
- MgCl₂ 20 mM
- KCl 10 mM
- ATP 5mM
- NaHCO₃ 30mM
- Creatina fosfato 5mM
- BSA + Triton X-100 1.1mg/ml

Tras este tiempo de incubación, en el que se consigue carbamilar todos los sitios activos del enzima, se añadió el resto de enzimas (creatina kinasa, PGK, GAPD) necesarias para que se produzca la cascada de reacciones, el NADH y la RuBP, y se midió en un espectrofotómetro cuyo portacubetas estaba termostatzado a la temperatura de medida deseada, para lo que se conectó un baño de agua al espectrofotómetro. Este paso se repitió una vez para cada temperatura, de forma que se realizaron cinco medidas de actividad total y una inicial por cada muestra. Tanto la actividad inicial como la total, se expresaron en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El estado de activación se estimó como la actividad inicial en porcentaje de la actividad total.

Teniendo en cuenta que la solubilidad del CO₂ disminuye con el aumento de la temperatura, se deseaba comprobar si la concentración de NaHCO₃ que se utilizaba (10mM) era la más correcta para todo el rango de temperaturas utilizado. Tras realizar análisis con 10 mM, 30 mM y 60 mM, se llegó a la conclusión de que la concentración óptima era 30 mM.

Al igual que los valores obtenidos *in vivo*, los valores de V_{cmax} obtenidos *in vitro* también se normalizaron a una temperatura de referencia de 25 °C (Medlyn et al. 2002) y se ajustaron a una función de Arrhenius (Ec. 3.12).

3.3.4. Medida de la aclimatación de los estomas y la fotosíntesis

Para comparar las respuestas a largo plazo (aclimatación) al CO₂ de crecimiento, se utilizaron la conductancia de los estomas (g_s), la velocidad de fotosíntesis (A) y la razón de concentraciones de CO₂ en los espacios intercelulares de la hoja y en el aire externo (C_i/C_a) medidas a 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ como se detalla en el apartado 3.3.2.

La sensibilidad de los estomas al CO₂ de crecimiento se valoró con la pendiente y la ordenada en el origen de la regresión lineal de g_s sobre el $\ln(C_i)$. Las respuestas de g_s al CO₂ a largo plazo, o de aclimatación, y a corto plazo, o directa, se cuantificaron con las razones de g_s según Bunce (2001), y el efecto neto como el producto de los efectos de aclimatación y directo:

$$\frac{g_s(e, E)}{g_s(a, A)} = \left[\frac{g_s(e, E)}{g_s(a, E)} \right] \cdot \left[\frac{g_s(a, E)}{g_s(a, A)} \right] \quad \text{Ec. 3.14}$$

donde a y e denotan las condiciones de crecimiento en CO₂ ambiente (370 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) y elevado (700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$), respectivamente, y A y E denotan las condiciones de medida en CO₂ ambiente (370 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) y elevado (700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). Se calcularon unas razones similares para la velocidad de fotosíntesis.

La relación entre la conductancia de los estomas y la velocidad de fotosíntesis en plantas que crecieron en CO₂ ambiente y elevado se analizó utilizando el modelo de Ball et al. (1987):

$$g_s = g_0 + g_1 \frac{A \cdot H_r}{C_a} \quad \text{Ec. 3.15}$$

donde A es la velocidad de fotosíntesis ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), H_r es la humedad relativa en la superficie de la hoja, C_a es la concentración de CO₂ del aire ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), y g_0 y g_1 son los parámetros de la regresión. Las condiciones de medida de g_s y A fueron 370 y 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ para el crecimiento en CO₂ ambiente y elevado, respectivamente.

La limitación de la fotosíntesis por parte de los estomas se calculó (Farquhar & Sharkey 1982) como la disminución relativa de la velocidad de fotosíntesis con respecto

a la que se obtendría si C_i fue igual a C_a , es decir, si no hubiera una limitación a la difusión del CO_2 al interior de la hoja por parte de los estomas:

$$\frac{(A(C_a) - A(C_i)) \cdot 100}{A(C_a)} \quad \text{Ec. 3.16}$$

3.4. Tratamiento estadístico

Para el experimento de campo de los años 2002-2003 el diseño del experimento principal fue de parcelas divididas (strip-plot) con bloques al azar, con el año como bloque, el CO_2 en las parcelas principales, temperatura y nitrógeno en hileras y columnas dentro de las parcelas principales, y las muestras repetidas en subparcelas bajo las hileras y columnas. En el estudio de la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura se excluyó el nivel de nitrógeno y la temperatura de medida constituyó un nuevo estrato bajo las muestras repetidas. Con este diseño experimental, se llevó a cabo el análisis de la varianza utilizando el paquete estadístico Genstat 6.2.

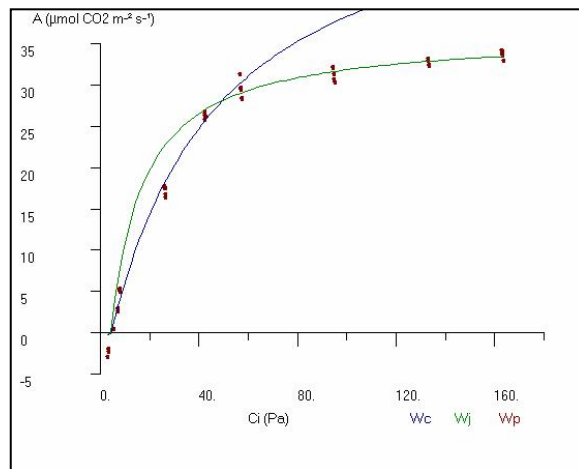
En dichos experimentos, para estudiar la respuesta a la temperatura de medida de la fotosíntesis y de $V_{\text{cmáx}}$ se ajustaron regresiones con el mismo paquete estadístico Genstat 6.2. Se usó un polinomio de segundo grado para ajustar los datos de fotosíntesis mientras que para $V_{\text{cmáx}}$, ajustado a una ecuación de Arrhenius, se utilizaron regresiones lineales simples.

Las regresiones de los diferentes tratamientos se compararon mediante análisis de paralelismo (Genstat 6.2), que ajusta primero un modelo común para todos los tratamientos. Seguidamente el modelo se amplía para incluir una constante (interceptación u ordenada en el origen en los polinomios de segundo grado y V_{25} en las regresiones lineales) diferente para cada tratamiento, dando una serie de funciones paralelas, una para cada tratamiento. Un tercer modelo final, incluye la constante y los coeficientes de regresión diferentes para cada tratamiento, dando líneas que difieren en la magnitud y la forma (pendiente) de la respuesta a la temperatura de cada tratamiento. En cada uno de los tres pasos o modelos, se lleva a cabo un análisis acumulado de varianza que muestra el cambio en la nueva regresión comparada con la del modelo anterior. Si el cambio en la regresión debido al tercer modelo final es significativo,

entonces hay evidencia de falta de paralelismo, y han de ajustarse regresiones separadas para cada tratamiento (curvas separadas $P < 0.05$), esto implica que la respuesta a la temperatura es significativamente diferente entre tratamientos. Si el no-paralelismo no alcanza significación (curvas separadas $P > 0.05$), entonces el modelo precedente en el análisis acumulado de varianzas (segundo modelo que incluye una constante diferente para cada tratamiento) valora si se necesitan interceptaciones diferentes. Si es así y el cambio respecto al primer modelo (modelo común) es significativo (interceptaciones separadas $P < 0.05$) se obtienen líneas paralelas, lo que indica que las regresiones para los diferentes tratamientos difieren en elevación, pero muestran la misma respuesta a la temperatura. Si este modelo no alcanza significación, el primer modelo, con una única regresión ajustada a todos los datos valora si hay una relación significativa con la temperatura (curva común $P < 0.05$).

Se realizaron varios análisis de paralelismo con el fin de ver todos los efectos que podían producir tanto CO_2 como temperatura de crecimiento y su interacción. Por ello, se compararon las cuatro combinaciones de tratamientos, las concentraciones de CO_2 de crecimiento, las dos temperaturas de crecimiento, las temperaturas de crecimiento dentro de cada CO_2 de crecimiento y las concentraciones de CO_2 de crecimiento dentro de cada temperatura.

Para el experimento realizado en cámara de crecimiento, los valores de todos los parámetros de la fotosíntesis y sus funciones de respuesta a la temperatura se calcularon separadamente para cada hoja. Las regresiones lineales de estimación de Γ^* , R_d , V_{cmax} , J y J_{max} y las exponenciales de dependencia de los parámetros respecto a la temperatura se ajustaron con el software Excel (Microsoft). Las varianzas de los datos obtenidos para cada hoja se analizaron como en un diseño de dos vías (temperatura y CO_2 ; parámetros fotosintéticos) o de una vía (CO_2 ; parámetros de dependencia respecto a la temperatura) con seis repeticiones sin bloques, con el software estadístico Genstat 6.2.



RESULTADOS

4.1. Aclimatación de los estomas y la fotosíntesis al CO₂ y la temperatura elevados

4.1.1. Condiciones ambientales en las cámaras de gradiente de temperatura

La Figura 4.1.1 muestra que, en los experimentos de campo, la concentración de CO₂ en el aire aumentó efectivamente de 376 ± 34 a 757 ± 29 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ y que la diferencia de temperatura entre los extremos de las cámaras estuvo próxima a 4 °C (3.79 ± 0.9 y 4.0 ± 0.4 en CO₂ ambiente y elevado, respectivamente, en 2002, y 3.8 ± 0.3 en ambas cámaras en 2003).

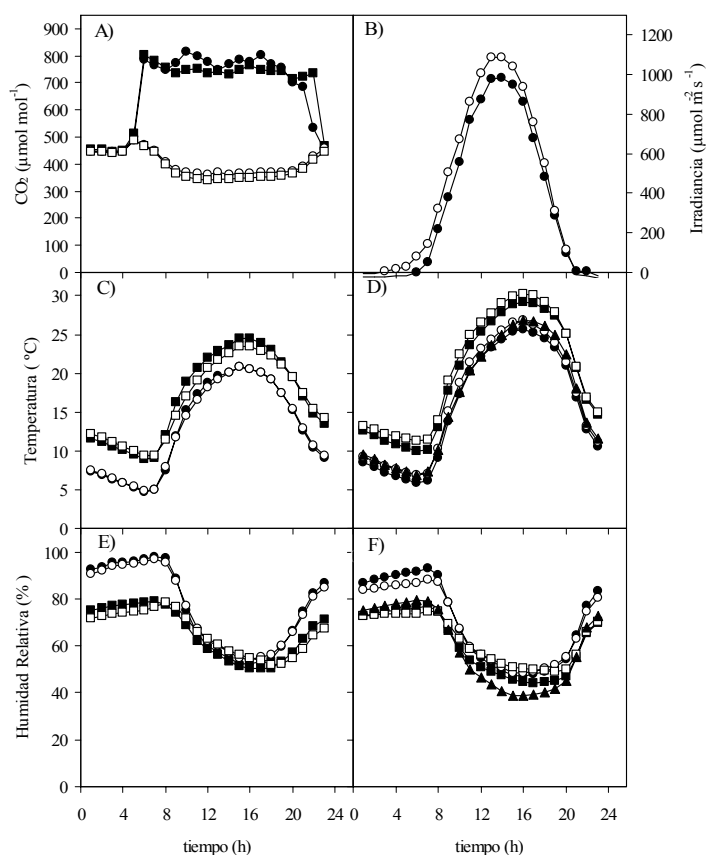


Fig 4.1.1. Curso medio diario de la concentración de CO₂ (A), la temperatura (C,D) y la humedad (E, F) en 2002 (C, E) y 2003 (D, F) en cámaras de gradiente de temperatura fijadas a CO₂ ambiente ($370 \mu\text{mol mol}^{-1}$, \circ , \square) o elevado ($700 \mu\text{mol mol}^{-1}$, \bullet , \blacksquare) y a temperaturas ambiente (\circ , \bullet) o ambiente + 4 °C (\square , \blacksquare). La irradiancia fuera y dentro de las cámaras (\circ , \bullet , respectivamente) se muestra en (B) y la temperatura y humedad fuera de las mismas (\blacktriangle) se muestra en (D) y (F).

La humedad del aire en las horas centrales del día fue similar con las dos concentraciones de CO₂ y las dos temperaturas, mientras que al final del día y en la noche fue más baja con temperaturas más cálidas. En el módulo con temperatura más baja, la

temperatura fue similar, y la humedad más alta, que en el aire externo. La intensidad luminosa dentro de las cámaras fue el 89 % de la existente fuera de las mismas.

4.1.2. Conductancia de los estomas

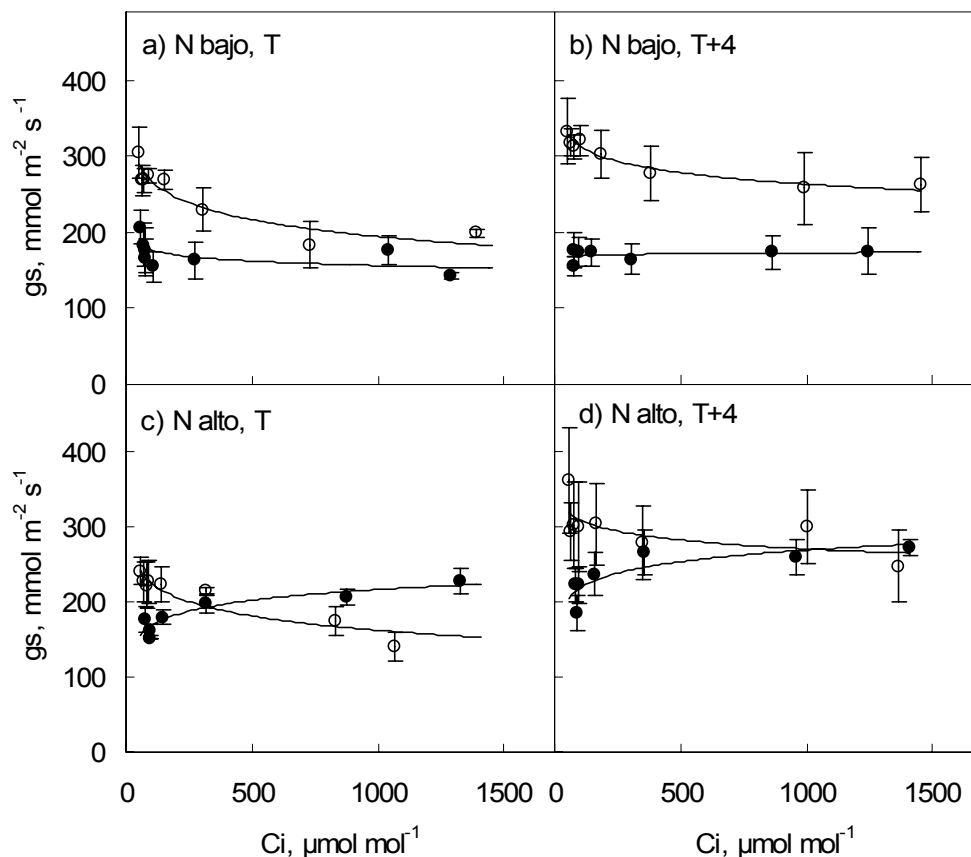


Fig 4.1.2. Respuesta de la conductancia de los estomas (g_s) a la concentración intercelular de CO_2 (C_i) para la última hoja de trigo crecido en el campo en cámaras de gradiente de temperatura, en CO_2 ambiente ($360\ \mu mol\ mol^{-1}$; ○) o elevado ($700\ \mu mol\ mol^{-1}$; ●) en 2002. Cada figura muestra los resultados de una combinación de suministro de nitrógeno (alto, bajo) y temperatura (T o T+4). Las medidas se hicieron en la emergencia de la espiga, la irradiancia fue de $1500\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ y la temperatura foliar de $25\ ^\circ C$. Los datos son medias de cuatro plantas repetidas (\pm error standard, s.e.) y las líneas son las regresiones ajustadas al modelo: $g_s = a + b \ln(C_i)$.

En general, la conductancia de los estomas (g_s) disminuyó al aumentar C_i en CO_2 de crecimiento ambiente, pero no en CO_2 elevado (Figs. 4.1.2 y 4.1.3), excepto con

suministro alto de nitrógeno y temperatura más cálida en 2003, con los cuales g_s disminuyó también con el aumento de C_i en CO₂ de crecimiento elevado (Fig. 4.1.3d). En estas figuras se muestran los datos en la emergencia de la espiga, pero en la antesis se obtuvieron pautas de respuesta similares (datos no mostrados). Se encontró menor g_s en plantas de CO₂ elevado para cualquier valor de C_i en plantas deficientes en N en 2002 (Fig. 4.1.2) y en todos los tratamientos en 2003 (Fig. 4.1.3).

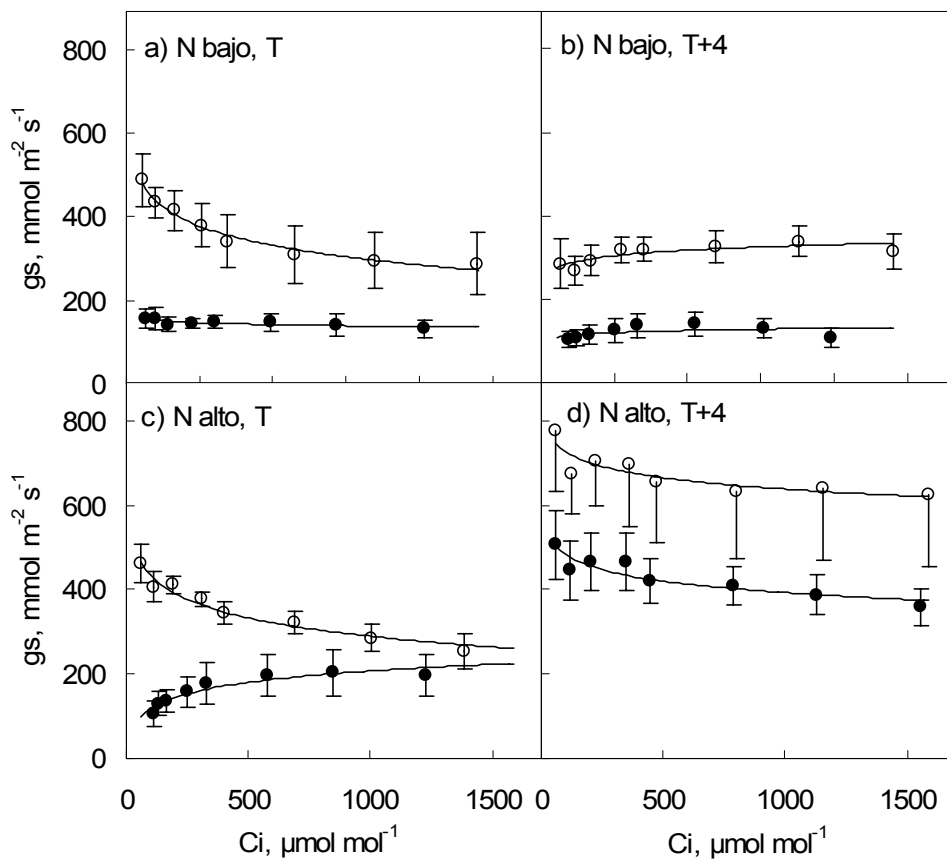


Fig 4.1.3. Respuesta de la conductancia de los estomas (g_s) a la concentración intercelular de CO₂ (C_i) para la última hoja de trigo crecido en el campo en cámaras de gradiente de temperatura, en CO₂ ambiente (360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$; O) o elevado (700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$; \bullet) en 2003. Cada figura muestra los resultados de una combinación de suministro de nitrógeno (alto, bajo) y temperatura (T o T+4). Las medidas se hicieron en la emergencia de la espiga, la irradiancia fue de 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la temperatura foliar de 25 °C. Los datos son medias de cuatro plantas repetidas (\pm error standard, s.e.) y las líneas son las regresiones ajustadas al modelo: $g_s = a + b \ln(C_i)$.

El análisis de regresiones de g_s sobre el $\ln(C_i)$ para todo el margen de C_i mostró pendientes mayores (más positivas) y ordenadas en el origen menores en CO_2 elevado, lo que indica que la sensibilidad de los estomas al CO_2 fue menor en plantas que crecieron en CO_2 elevado (Tabla 4.1.1). Excepto con CO_2 elevado y nitrógeno alto en 2003, la disminución de g_s con C_i creciente fue más pronunciada en temperatura ambiente que en ambiente + 4 °C, lo que sugiere que las temperaturas más altas disminuyeron la sensibilidad de los estomas al CO_2 .

Tabla 4.1.1. Parámetros del modelo de regresión $y = a + b \ln x$ para la respuesta de la conductancia de los estomas a la concentración intercelular de CO_2 en la emergencia de la espiga, en la última hoja de trigo crecido en el campo en cámaras de gradiente de temperatura en CO_2 elevado ($700 \mu\text{mol mol}^{-1}$) o ambiente ($360 \mu\text{mol mol}^{-1}$), temperatura ambiente o ambiente + 4 °C, y suministro alto o bajo de nitrógeno en 2002 y 2003. D es el porcentaje de la varianza explicado por las rectas de regresión para CO_2 ambiente y elevado, ajustadas mediante regresión lineal con grupos (GenStat 6.2, 2002).

Año	Temperatura	Nitrógeno	CO_2 elevado			CO_2 ambiente			D (%)
			a	b	R^2	a	b	R^2	
2002	Ambiente (T)	bajo	216	-8.7	0.31	414	-31.8	0.88	89.7
		alto	73	20.9	0.86	352	-27.4	0.86	98.8
	T + 4	bajo	161	-1.7	0.07	413	-21.8	0.95	84.6
		alto	117	22.1	0.72	385	-17.0	0.45	73.7
2003	Ambiente (T)	bajo	185	-6.8	0.64	757	-66.6	0.98	99.5
		alto	-62	38.9	0.90	722	-62.7	0.96	98.1
	T + 4	bajo	77	7.5	0.21	194	19.3	0.69	98.6
		alto	666	-39.6	0.85	907	-38.9	0.78	97.1

El efecto negativo del CO_2 elevado en g_s medida con $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 fue menos pronunciado en 2002 que en 2003 (Tabla 4.1.2). En el primer año, la disminución de g_s con el CO_2 elevado tendió a ser menor con un suministro alto de nitrógeno – de hecho, después de la antesis g_s aumentó en CO_2 elevado con N alto -, aunque la interacción $\text{CO}_2 \times \text{N}$ no alcanzó significación (Tabla 4.1.3).

Las interacciones N x fecha y temperatura x N x fecha fueron significativas ($P < 0,05$, Tabla 4.1.3), lo que indica que las temperaturas altas disminuyeron g_s en N alto después de la antesis, pero la aumentaron en otros casos. En el segundo año, g_s disminuyó

fuertemente en CO₂ elevado con las dos temperaturas y los dos niveles de nitrógeno (Tablas 4.1.2 y 4.1.3). Además, en 2003 la interacción temperatura x N fue significativa ($P < 0,05$), como resultado del aumento en g_s con la temperatura en N alto pero no en N bajo (Tabla 4.1.2).

La respuesta a largo plazo, o de aclimatación, de g_s (medida a 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂) al CO₂ elevado fue mayor en 2003 que en 2002 (Tabla 4.1.4). Con suministro alto de N, no hubo aclimatación de g_s en 2002, y no hubo diferencias en la respuesta de aclimatación entre las dos temperaturas de crecimiento en ningún año (Tabla 4.1.4).

Tabla 4.1.2. Valores medios (\pm s.e.) de la conductancia estomática ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) medida en 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ en últimas hojas de trigo crecido en el campo en cámaras de gradiente de temperatura en CO₂ elevado (700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) o ambiente (360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$), temperatura ambiente (T) o ambiente +4 °C (T+4), y suministro de nitrógeno bajo o alto, en 2002 y 2003. Las medidas se realizaron en la emergencia de la espiga y 8-15 días después de la antesis. La irradiancia fue de 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la temperatura foliar de 25 °C.

Fase	Nitrógeno	CO ₂ elevado		CO ₂ ambiente	
		T	T + 4	T	T + 4
2002					
Emergencia de la espiga	bajo	168 \pm 23	178 \pm 23	230 \pm 28	283 \pm 41
	alto	201 \pm 15	257 \pm 32	217 \pm 16	297 \pm 51
Después de la antesis	bajo	166 \pm 12	259 \pm 76	243 \pm 28	274 \pm 50
	alto	234 \pm 32	166 \pm 22	202 \pm 27	130 \pm 38
2003					
Emergencia de la espiga	bajo	151 \pm 15	137 \pm 30	341 \pm 64	319 \pm 28
	alto	178 \pm 48	421 \pm 53	346 \pm 26	655 \pm 145
Después de la antesis	bajo	150 \pm 5	91 \pm 19	384 \pm 65	327 \pm 103
	alto	137 \pm 30	193 \pm 22	281 \pm 25	540 \pm 80

En plantas crecidas en CO₂ ambiente, el aumento del CO₂ de medida de 350 a 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ (respuesta a corto plazo, o directa) disminuyó g_s en 0-13% (Tabla 4.1.4). Por tanto, la respuesta neta de g_s al CO₂ elevado fue una reducción con N bajo en 2002 y con los dos suministros de N en 2003, a las dos temperaturas (Tabla 4.1.4).

Tabla 4.1.3. Análisis de la varianza (Valores de F) para la conductancia de los estomas (gs) y la velocidad de fotosíntesis (An) medidas con 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , y el contenido de clorofila en hojas últimas de trigo crecido en el campo en cámaras de gradiente de temperatura en CO_2 elevado (700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) o ambiente (360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$), temperatura ambiente o ambiente + 4 °C, y suministro de nitrógeno bajo o alto, en 2002 y 2003. Medidas tomadas en dos fases de desarrollo (emergencia de la espiga y después de la antesis). Los números en negrita representan efectos significativos ($P < 0.05$).

	gs		An		Clorofila	
	2002	2003	2002	2003	2002	2003
CO_2 (C)	2.47	11.93	6.61	13.07	0.20	3.23
Temperatura						
(T)	1.59	5.77	2.68	1.16	7.27	0.11
Nitrógeno (N)	0.45	4.77	0.00	24.09	31.94	114.87
CT	0.00	2.47	2.15	0.00	0.11	0.20
CN	3.64	0.03	2.27	2.25	1.29	0.08
TN	1.79	7.50	0.00	5.13	2.96	1.42
CTN	0.06	0.84	0.35	5.30	2.12	0.50
Fecha (F)	3.92	4.18	10.33	46.96	96.40	26.50
CF	6.69	0.01	0.00	0.85	5.95	0.20
TF	7.37	2.12	4.90	3.38	0.29	2.28
NF	17.20	1.33	3.73	0.62	4.21	0.76
CTF	3.06	0.06	4.88	0.03	1.64	0.31
CNF	0.34	0.00	1.14	1.56	0.53	0.21
TNF	18.88	0.05	5.65	0.13	1.47	0.88
CTNF	1.04	0.33	1.70	0.88	1.62	0.39

Tabla 4.1.4. Respuestas de aclimatación, directa y neta de la conductancia de los estomas al CO₂ elevado en hojas últimas de trigo crecido en el campo en cámaras de gradiente de temperatura, en temperatura ambiente (T) o ambiente + 4 °C (T+4), y con suministro bajo o alto de nitrógeno, en 2002 y 2003. Los valores son medias de dos fases de desarrollo (emergencia de la espiga y después de la antesis) y cuatro medidas en plantas repetidas. Más detalles en Material y Métodos, apartado 3.3.4.

Año	Temperatura	Nitrógeno	<u>Respuestas de los estomas</u>		
			<u>Aclimatación</u> [gs(e,E)/gs(a,E)]	<u>Directa</u> [gs(a,E)/gs(a,A)]	<u>Efecto neto</u> [gs(e,E)/gs(a,A)]
2002	T	bajo	0.71	1.01	0.71
		alto	1.04	1.07	1.11
	T+4	bajo	0.78	0.89	0.69
		alto	1.07	0.94	1.00
2003	T	bajo	0.42	0.87	0.36
		alto	0.50	0.89	0.45
	T+4	bajo	0.35	0.96	0.35
		alto	0.50	0.92	0.46

4.1.3. Fotosíntesis

En ambos años, A medida con 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ fue significativamente menor ($P < 0.05$, Tabla 4.1.3) en CO₂ elevado que ambiente. El efecto de la fecha fue también significativo ($P < 0.05$), debido a la disminución de A después de la antesis (Tabla 4.1.5). En 2003, el efecto del CO₂ elevado en A varió con el nitrógeno y la temperatura ($P < 0.05$ para la interacción CO₂ x temperatura x N); la disminución de A fue menor en temperatura ambiente + 4 °C y N alto. Así, la aclimatación de la fotosíntesis se detectó los dos años, pero fue mayor en 2003 que 2002 (Tabla 4.1.6).

Tabla 4.1.5. Valores medios (\pm s.e.) de la velocidad de fotosíntesis ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) medida en $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 en últimas hojas de trigo crecido en el campo en cámaras de gradiente de temperatura en CO_2 elevado ($700 \mu\text{mol mol}^{-1}$) o ambiente ($360 \mu\text{mol mol}^{-1}$), temperatura ambiente (T) o ambiente $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ (T+4), y suministro de nitrógeno bajo o alto, en 2002 y 2003. Las medidas se realizaron en la emergencia de la espiga y 8-15 días después de la antesis. La irradiancia fue de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la temperatura foliar de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Fase	Nitrógeno	<u>CO_2 elevado</u>		<u>CO_2 ambiente</u>	
		T	T + 4	T	T + 4
2002					
Emergencia de la espiga	bajo	35.7 ± 6.1	32.5 ± 4.5	40.7 ± 4.0	39.9 ± 5.8
	alto	37.5 ± 2.3	40.3 ± 3.5	40.3 ± 1.3	43.4 ± 4.4
Después de la antesis	bajo	32.4 ± 4.9	33.6 ± 10.2	43.4 ± 6.1	38.3 ± 3.8
	alto	34.2 ± 4.6	33.6 ± 6.0	40.9 ± 5.9	26.9 ± 10.7
2003					
Emergencia de la espiga	bajo	24.3 ± 2.1	17.9 ± 2.0	36.7 ± 2.5	39.1 ± 1.0
	alto	28.5 ± 5.5	39.1 ± 1.0	42.3 ± 1.9	41.6 ± 1.4
Después de la antesis	bajo	21.0 ± 1.1	12.2 ± 1.4	30.9 ± 2.2	25.7 ± 2.5
	alto	21.9 ± 4.4	31.1 ± 2.0	34.5 ± 2.1	32.2 ± 3.6

Debido a la gran estimulación de la fotosíntesis al aumentar el CO_2 de medida de 350 a $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (efecto directo), el efecto neto del CO_2 elevado fue un aumento de la fotosíntesis, excepto en plantas que habían crecido con suministro bajo de nitrógeno y temperaturas altas en 2003, que experimentaron la mayor aclimatación (Tabla 4.1.6).

Tabla 4.1.6. Respuestas de aclimatación, directa y neta de la velocidad de fotosíntesis (A) al CO₂ elevado en hojas últimas de trigo crecido en el campo en cámaras de gradiente de temperatura, en temperatura ambiente (T) o ambiente + 4 °C (T+4), y con suministro bajo o alto de nitrógeno, en 2002 y 2003. Los valores son medias de dos fases de desarrollo (emergencia de la espiga y después de la antesis) y cuatro medidas en plantas repetidas. Más detalles en Material y Métodos, apartado 3.3.4.

Año	Temperatura	Nitrógeno	<u>Respuestas fotosintéticas</u>		
			<u>Acclimatación</u>	<u>Directa</u>	<u>Efecto neto</u>
			[A(e,E)/A(a,E)]	[A(a,E)/A(a,A)]	[A(e,E)/A(a,A)]
2002	T	bajo	0.80	1.92	1.53
		alto	0.87	2.04	1.75
	T+4	bajo	0.83	1.77	1.53
		alto	1.05	1.83	1.93
2003	T	bajo	0.67	1.73	1.16
		alto	0.65	1.79	1.17
	T+4	bajo	0.47	1.69	0.79
		alto	0.80	1.65	1.32

4.1.4. Razón C_i/C_a y limitación estomática

La razón entre el CO₂ intercelular y el del ambiente (C_i/C_a) en hojas medidas con 700 μmol mol⁻¹ de CO₂ fue similar entre plantas crecidas en CO₂ ambiente y elevado en 2002 (media de 0.48 ± 0.03), pero en el segundo año la razón C_i/C_a media fue menor en plantas de CO₂ elevado (0.58 ± 0.02) que de CO₂ ambiente (0.68 ± 0.02).

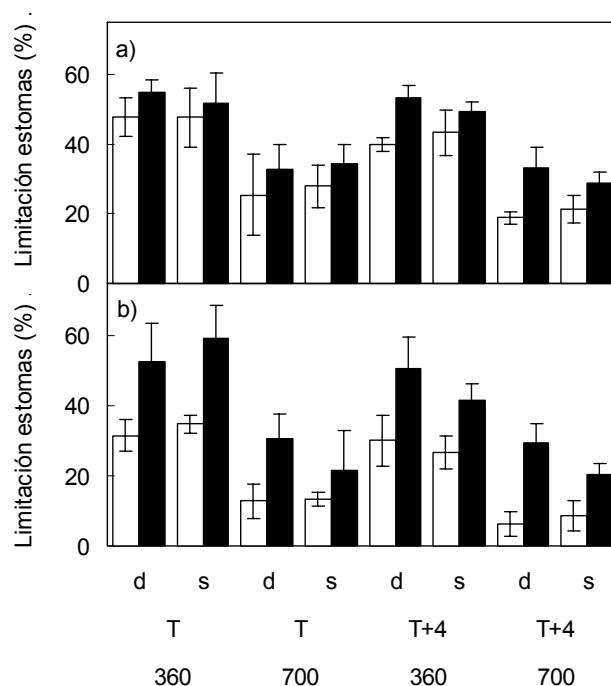


Fig 4.1.4. Limitación de la fotosíntesis por los estomas en hojas últimas de trigo crecido en el campo en cámaras de gradiente de temperatura en CO₂ ambiente (barras blancas) o elevado (barras negras), temperatura ambiente (T) o ambiente + 4 °C (T+4) y suministro de nitrógeno bajo (d) o alto (s). Las medidas se realizaron con 360 μmol mol⁻¹ (360) o 700 μmol mol⁻¹ (700) de CO₂ en la emergencia de la espiga en 2002 (a) y 2003 (b). La irradiancia fue de 1500 μmol m⁻² s⁻¹ y la temperatura foliar de 25 °C. Los datos son medias de cuatro medidas en plantas repetidas (± s.e.).

En la emergencia de la espiga en 2002, la limitación de la fotosíntesis por los estomas, medida con una concentración de CO₂ común para todos los tratamientos, fue similar para plantas de CO₂ ambiente y elevado y temperatura ambiente, pero fue mayor en CO₂ elevado a temperaturas 4 °C por encima de las ambientales (Fig. 4.1.4). En 2003, la limitación de la fotosíntesis por parte de los estomas con una concentración común de CO₂ fue más alta en CO₂ elevado que ambiente, con las dos temperaturas de crecimiento. Sin embargo, comparada a la concentración de CO₂ de crecimiento respectiva, la limitación por parte de los estomas disminuyó en CO₂ elevado, excepto con nitrógeno bajo en 2003. Después de la antesis se observaron respuestas similares (no mostradas).

Medidas con 700 μmol mol⁻¹ de CO₂, las relaciones entre C_i/C_a y g_s fueron curvilíneas (Fig. 4.1.5). No se encontró correlación entre C_i/C_a y A (el valor de r fue 0.2 en 2002 y 0.35 en 2003). Cuando los datos de g_s y A_n, medidos en sus respectivas concentraciones de CO₂ de crecimiento, se ajustaron al modelo de Ball et al. (1987) – Ec. 3.15 -, se encontró una relación única para las plantas crecidas en ambos niveles de CO₂ en

temperatura ambiente, indicando que los estomas se aclimataron en paralelo con la fotosíntesis (Fig. 4.1.6). En cambio, hubo una diferencia significativa entre las relaciones para CO₂ ambiente y elevado entre las plantas crecidas a temperatura ambiente + 4 °C, y la relación para las plantas a temperatura ambiente se separó significativamente de la de ambiente + 4 °C.

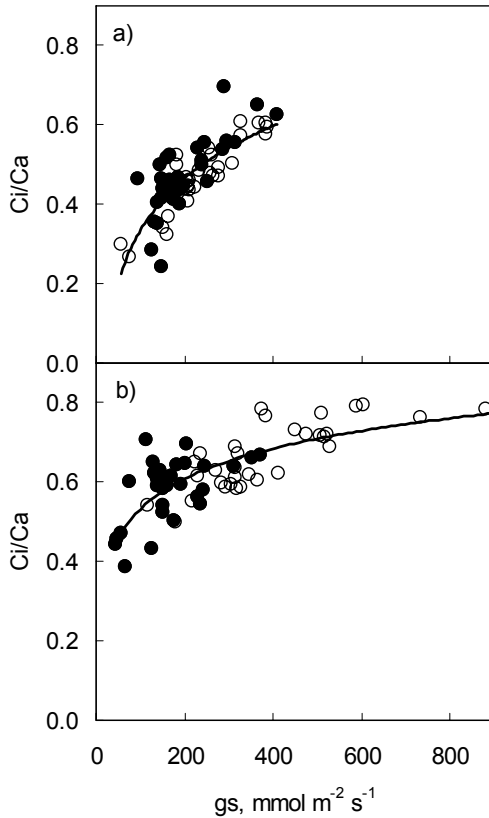


Fig 4.1.5. Relación entre la razón del CO₂ intercelular y el ambiente (Ci/Ca) y la conductancia de los estomas (gs) en últimas hojas de trigo crecido en el campo en cámaras de gradiente de temperatura en CO₂ ambiente (○) o elevado (●), en 2002 (a) y en 2003 (b). Las medidas se hicieron con 700 μmol mol⁻¹ de CO₂ en la emergencia de la espiga y poco después de la antesis. Las curvas de regresión son: a) Ci/Ca = -0.54 + 0.19 ln(gs), r² = 0.63; b) Ci/Ca = 0.04 + 0.11 ln(gs), r² = 0.62. N = 64 en ambos casos.

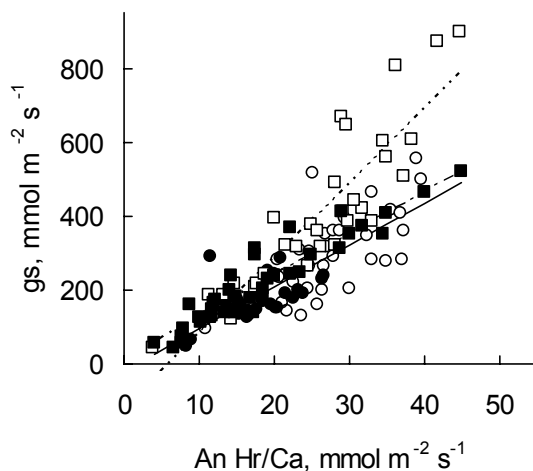


Fig 4.1.6 Ajustes del modelo de Ball et al. (1987) para la conductancia de los estomas (g_s) en la emergencia de la espiga y poco después de la antesis en 2002 y 2003 en hojas últimas de trigo crecido en el campo en cámaras de gradiente de temperatura con dos niveles de suministro de nitrógeno. ●) CO_2 elevado y temperatura ambiente; ■) CO_2 elevado y temperatura ambiente + 4 °C; ○) CO_2 y temperatura ambientes; □) CO_2 ambiente y temperatura ambiente + 4 °C. Los parámetros de la regresión $g_s = a + b \text{ An Hr}/CO_2$ se indican más abajo. D es el porcentaje de varianza explicado por las rectas ajustadas utilizando regresión lineal con grupos (GenStat 6.2, 2002).

Temperatura	CO_2	a	b	r^2	D%
T + 4	Ambiente	-117.6	20.17	0.80	79.2
	Elevado	12.4	11.279	0.78	
T	Ambos	-19.5	11.279	0.61	

4.1.5. Concentración de clorofila

La concentración de clorofila por unidad de superficie no cambió con el CO_2 de crecimiento, pero disminuyó significativamente ($P < 0,05$) con el suministro bajo de N (Tabla 4.1.3). En 2002, la velocidad de fotosíntesis y g_s no se correlacionaron con la concentración de clorofila (Fig. 4.1.7a, c), pero en 2003 las menores fotosíntesis y g_s en CO_2 elevado se relacionaron con una menor concentración foliar de clorofila (Fig. 4.1.7b, d).

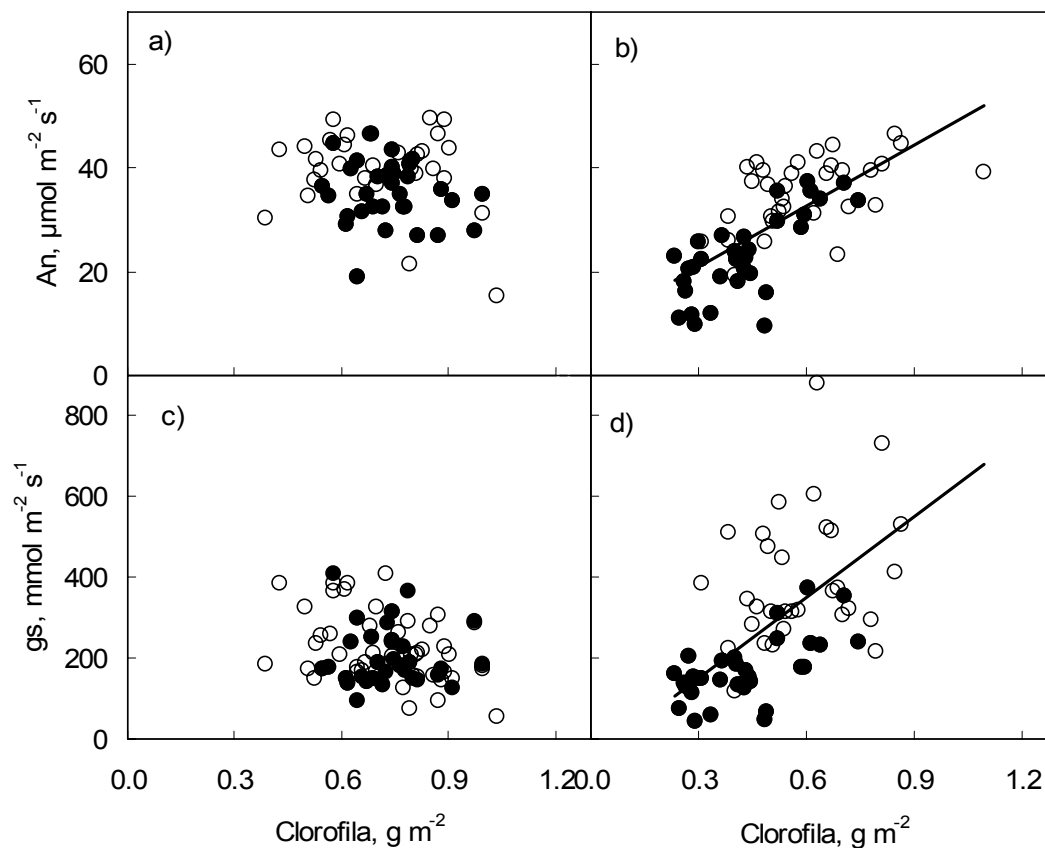


Fig 4.1.7. Relaciones con la concentración de clorofila por unidad de superficie foliar de: (a, b) la velocidad de fotosíntesis (A) y (c, d) la conductancia de los estomas (gs) en hojas últimas de trigo crecido en el campo en cámaras de gradiente de temperatura en CO₂ ambiente (360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$; \circ) o elevado (700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$; \bullet), en (a, c) 2002 y (b, d) 2003. Los coeficientes de determinación fueron: a) $R^2 = 0.04$, n.s.; b) $R^2 = 0.51$, $P < 0.001$; c) $R^2 = 0.09$, n.s.; d) $R^2 = 0.40$, $P < 0.001$. $N = 64$ en todos los casos.

4.2. Efectos del CO₂ y la temperatura elevados en la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura

4.2.1. Intercambio gaseoso

La respuesta de la fotosíntesis a la temperatura en el experimento de campo se estudió midiendo el intercambio gaseoso saturado por la luz a temperaturas desde 20 hasta 30 °C; debido a las altas temperaturas externas, no se consiguió disminuir la temperatura de la cámara foliar del IRGA hasta 15° C en todos los casos. Se describirán primero los resultados conjuntos de los dos años, obtenidos con una concentración de CO₂ durante las medidas de alrededor de 200 μmol mol⁻¹. El intercambio gaseoso con otras concentraciones de CO₂ en uno u otro año del experimento se detallará a continuación.

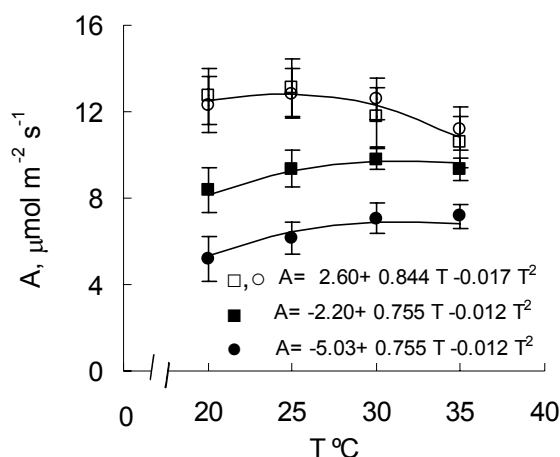


Fig 4.2.1. Respuestas de la fotosíntesis a la temperatura foliar en hojas últimas de trigo crecido en 370 μmol mol⁻¹ CO₂ (símbolos abiertos) o 700 μmol mol⁻¹ CO₂ (símbolos cerrados) combinados con temperatura ambiente (círculos) o ambiente + 4 °C (cuadrados). El intercambio gaseoso se midió con 200 (primer año) - 225 (segundo año) μmol mol⁻¹ CO₂ e irradiancia de 1500 μmol mol⁻¹. La significación de las diferencias entre líneas de regresión está dada por el análisis de paralelismo en la Tabla 4.2.2. Las regresiones se ajustaron con 8 datos por combinación de tratamientos y temperatura de medida y se muestran las medias ± error standard (barras verticales).

Con una concentración de CO₂ en el aire de 200-225 μmol mol⁻¹, dentro del margen en el que la fotosíntesis está normalmente limitada por la actividad Rubisco, el crecimiento en CO₂ elevado provocó una disminución de la asimilación de carbono de un 35 % (Fig. 4.2.1). Sin embargo, esta disminución no alcanzó la alta razón de varianzas requerida para que el efecto del CO₂ fuera significativo con el diseño experimental adoptado (Tabla 4.2.1).

Tabla 4.2.1. Probabilidades (*F*) en el análisis de la varianza para la fotosíntesis y la V_{cmax} de la Rubisco medidas a 20, 25, 30 y 35 °C. Análisis efectuados entre la emergencia de la espiga y la antesis en hojas últimas de trigo crecido en 370 o 700 $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ combinados con temperatura ambiente o ambiente + 4 °C. La fotosíntesis se midió con 200 (primer año)- 225 (segundo año) $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ e irradiancia de 1500 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. V_{cmax} se midió *in vitro* el primer año de experimento y a partir de la respuesta A-Ci el segundo año. ns, no significativo.

Fuente de varianza	<i>F</i>	
	Fotosíntesis	V_{cmax}
CO2	ns	0.033
Temp	0.013	ns
CO2.Temp	0.01	0.065
T medida	0.026	<.001
Lineal	ns	<.001
Cuadrático	0.003	0.07
CO2.T medida	<0.001	0.095
CO2.Lineal	<0.001	0.021
CO2.Cuadrático	ns	ns
Temp.T medida	ns	ns
Temp.Lineal	0.068	ns
Temp.Cuadrático	ns	ns
CO2.Temp.T medida	ns	ns
CO2.Temp.Lineal	ns	ns
CO2.Temp.Cuadrático	ns	ns

La temperatura de crecimiento no tuvo efecto en la fotosíntesis de plantas crecidas en CO_2 ambiente, mientras que la aumentó en las crecidas en CO_2 elevado, siendo significativa esta interacción (Tabla 4.2.1). La fotosíntesis mostró a su vez un aumento seguido de una disminución al crecer la temperatura, como muestra el componente cuadrático significativo de esta respuesta. La interacción significativa indica que el CO_2 elevado modificó la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura de medida; el componente lineal significativo en el análisis de la varianza indica que la ordenada en el origen de la regresión de la fotosíntesis sobre la temperatura fue menor en CO_2 elevado que en ambiente, y que las temperaturas de medida crecientes tuvieron

un efecto general sobre la fotosíntesis negativo en CO₂ ambiente y positivo en CO₂ elevado (Fig. 4.2.1).

La forma de la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura de medida se examinó más detalladamente mediante regresión lineal múltiple con grupos (análisis de paralelismo). Con alrededor de 200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ de medida, la comparación de las plantas crecidas en CO₂ ambiente y elevado (Tabla 4.2.2) mostró una diferencia significativa en la elevación (ordenada en el origen) de la curva fotosíntesis-temperatura, con un valor menor para CO₂ alto (Fig. 4.2.1). Esto muestra que el CO₂ elevado disminuyó la capacidad fotosintética. Además, la ausencia de paralelismo (modelo con curvas separadas significativo) indica que la fotosíntesis tuvo una respuesta a la temperatura significativamente diferente para plantas crecidas en las dos concentraciones de CO₂, aumentando la fotosíntesis más y hasta temperaturas más altas en CO₂ elevado (alrededor de 32 °C y 24 °C para CO₂ alto y ambiente, respectivamente). Las respuestas de la fotosíntesis a la temperatura no fueron significativamente diferentes para plantas crecidas en temperatura ambiente y ambiente + 4 °C y CO₂ ambiente. En cambio, esta respuesta fue diferente para ambas temperaturas de crecimiento en CO₂ elevado (modelo con ordenadas en el origen separadas significativo, Tabla 4.2.2), con una mayor elevación para temperatura ambiente + 4 °C (Fig. 4.2.1). Esto muestra que las temperaturas más cálidas tuvieron un efecto positivo en la fotosíntesis en CO₂ elevado, pero no en CO₂ ambiente. Este efecto positivo consistió en un aumento de las velocidades de fotosíntesis, y no en un cambio en la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura (modelo de regresión con curvas separadas no significativo, Tabla 4.2.2).

Tabla 4.2.2. Razones de varianza (r.v.) y probabilidades (F) del análisis acumulativo de la varianza en el análisis de modelos paralelos para las respuestas a la temperatura de la fotosíntesis y la velocidad máxima de carboxilación del enzima Rubisco (V_{cmax}). La fotosíntesis se midió los dos años con 200-225 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 y en uno sólo de los años con 1000 (2002) 60, 135 y 330 (2003) $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 . (n.s.) significa no significativo estadísticamente. Análisis comparativos de todos los tratamientos (Trat), de las dos concentraciones de CO_2 (CO_2), las dos temperaturas (Temp), y las dos temperaturas en CO_2 de crecimiento ambiente (AmbTemp) y elevado (ElevTemp).

Comparación	Ordenada Orig.						
	Curva común		separada		Curvas separadas		
	r.v.	F	r.v.	F	r.v.	F	
A200 (2 años)	Trat	1,95	(n.s.)	30,95	<0,001	1,13	(n.s.)
	CO2	1,00	(n.s.)	70,14	<0,001	2,76	(0,069)
	Temp	0,64	(n.s.)	4,08	0,046	0,23	(n.s.)
	AmbTemp	1,68	(n.s.)	0,06	(n.s.)	0,17	(n.s.)
	ElevTemp	2,93	(n.s.)	28,32	<0,001	0,31	(n.s.)
A1000 (Año 2002)	Trat	8,79	<0,001	8,52	<0,001	0,08	(n.s.)
	CO2	8,23	<0,001	15,06	<0,001	0,03	(n.s.)
	Temp	7,56	<0,001	0,6	(n.s.)	0,085	(n.s.)
	AmbTemp	2,67	(n.s.)	0,67	(n.s.)	0,01	(n.s.)
	ElevTemp	9,90	<0,001	17,58	0,001	0,43	(n.s.)
A60 (Año 2003)	Trat	244,71	<0,001	368,33	<0,001	20,08	<0,001
	CO2	217,94	<0,001	949,72	<0,001	47,17	<0,001
	Temp	60,38	<0,001	8,79	0,003	1,06	(n.s.)
	AmbTemp	303,66	<0,001	21,3	<0,001	5,48	<0,001
	ElevTemp	47,08	<0,001	18,29	<0,001	2,3	(n.s.)
A130 (Año 2003)	Trat	40,6	<0,001	431,7	<0,001	8,88	<0,001
	CO2	36,05	<0,001	876,84	<0,001	19,36	<0,001
	Temp	10,67	<0,001	4,75	0,03	1,21	(n.s.)
	AmbTemp	53,53	<0,001	0,78	0,379	1,89	(n.s.)
	ElevTemp	8,49	<0,001	41,33	<0,001	1,35	(n.s.)
A330 (Año 2003)	Trat	10,63	<0,001	294,88	<0,001	8,08	<0,001
	CO2	9,06	<0,001	698,18	<0,001	17,79	<0,001
	Temp	3,14	<0,05	6,51	0,011	0,74	(n.s.)
	AmbTemp	7,71	<0,001	0,37	0,545	0,17	(n.s.)
	ElevTemp	22,69	<0,001	60,96	<0,001	1,15	(n.s.)
Vcmax (2 años)	Trat	351,43	(<0,001)	14,12	(0,001)	1,73	(ns)
	CO2	340,94	(<0,001)	35,54	(<0,001)	3,13	(0,079)
	Temp	261,23	(<0,001)	0,58	(ns)	0,99	(ns)
	AmbTemp	682,31	(<0,001)	4,37	(0,041)	0,02	(ns)
	ElevTemp	125,57	(<0,001)	2,76	(ns)	1,08	(ns)

Las medidas de intercambio gaseoso realizadas en el año 2002 con $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , indican que el CO_2 de crecimiento modificó significativamente la relación de la fotosíntesis con la temperatura, siendo menor la elevación de la curva de respuesta en las plantas crecidas en CO_2 elevado (modelo con ordenadas en el origen separadas significativo, Tabla 4.2.2; Fig. 4.2.2). Sin embargo, a pesar de esta diferencia en la elevación, la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura no fue diferente, ya que los parámetros que caracterizan la pendiente no fueron significativamente distintos (modelo de regresión con curvas separadas no significativo, Tabla 4.2.2). Por ello, se obtuvieron curvas con elevación distinta pero paralelas. En las plantas que crecieron con CO_2 ambiente la temperatura de crecimiento no tuvo ningún efecto en la respuesta de la fotosíntesis a un cambio en la temperatura de medida (Fig. 4.2.2). En cambio, en las plantas crecidas bajo la influencia de la concentración elevada de CO_2 , el aumento de la temperatura de crecimiento 4°C por encima de la ambiental indujo un aumento en la elevación de la curva de respuesta de la fotosíntesis a la temperatura. En este caso los parámetros que caracterizan la pendiente tampoco variaron significativamente, de modo que la respuesta con ambas temperaturas fue paralela (Tabla 4.2.2). En las medidas con $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 hubo una regresión común que si se ajustaba significativamente tanto para los cuatro tratamientos en su conjunto como para las dos concentraciones de CO_2 y niveles de temperatura de crecimiento.

La fotosíntesis medida en 2003 con concentraciones de CO_2 de 60, 130, y $330 \mu\text{mol mol}^{-1}$ se muestra en la Figura 4.2.3. A medida que aumentó la concentración de CO_2 de medida, el óptimo de temperatura para la fotosíntesis fue más alto. Las curvas de respuesta de la fotosíntesis a la temperatura de medida fueron más altas para las plantas que crecieron en CO_2 ambiente que en CO_2 elevado (Tabla 4.2.2). Con un mismo CO_2 de crecimiento, estas curvas de respuesta fueron más altas en temperaturas 4°C superiores a la ambiente que en esta última, excepto en plantas crecidas en CO_2 ambiente y medidas con concentración de CO_2 de más de $60 \mu\text{mol mol}^{-1}$, que no mostraron diferencias entre temperaturas de crecimiento.

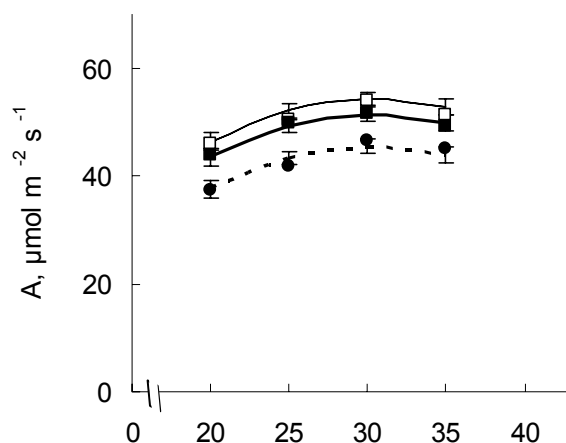


Fig 4.2.2. Respuesta de la fotosíntesis a la temperatura medida con $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 para plantas crecidas en $370 \mu\text{mol mol}^{-1}$ CO_2 (símbolos abiertos) o $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ CO_2 (símbolos cerrados) combinados con temperatura ambiente (círculos) o ambiente + $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (cuadrados). La significación estadística de las diferencias entre líneas de regresión está dada por el análisis de paralelismo de la Tabla 4.2.2. Los puntos representan medias \pm error estandar (barras verticales) de datos reales y las líneas son las curvas de regresión ajustadas a dichos datos.

En las medidas realizadas con el CO_2 mas bajo ($60 \mu\text{mol mol}^{-1}$), las curvas de respuesta de la fotosíntesis a la temperatura mostraron diferencias significativas (Tabla 4.2.2), tanto en elevación como en los parámetros que definen la pendiente, entre las plantas que crecieron en CO_2 elevado y las que lo hicieron en CO_2 ambiente. El máximo de fotosíntesis se alcanzó entre 20 y $25 \text{ }^\circ\text{C}$ para las plantas de CO_2 ambiente, con un descenso rápido entre 25 y $35 \text{ }^\circ\text{C}$, mientras que las plantas de CO_2 elevado tuvieron el máximo de fotosíntesis entre 25 y $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y un descenso no tan pronunciado hasta los $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Se encontraron también diferencias debidas a la temperatura de crecimiento. Así, con ambas concentraciones de CO_2 durante el crecimiento, la curva fotosíntesis-temperatura de medida tuvo mayor elevación en las plantas de temperatura de crecimiento $4 \text{ }^\circ\text{C}$ más alta. En las plantas crecidas en CO_2 ambiente, el descenso de la fotosíntesis al aumentar la temperatura de medida fue mayor para las plantas de temperatura ambiente y el máximo de fotosíntesis se situó en $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Para las plantas crecidas en CO_2 elevado, se obtuvieron curvas paralelas pero de elevación distinta, siendo mas alta la de las plantas que crecieron con una temperatura $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mas cálida.

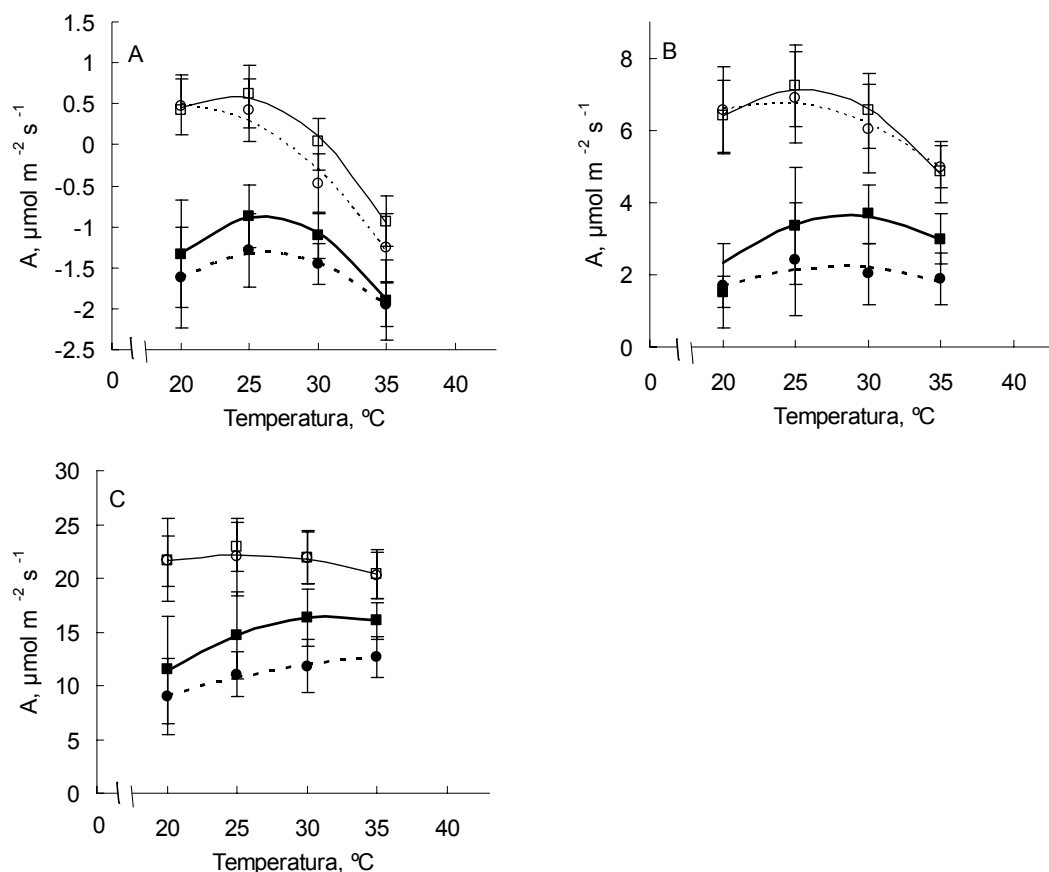


Fig 4.2.3. Respuesta de la fotosíntesis a la temperatura medida a 60 (A), 135 (B), y 330 (C) $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 para plantas crecidas en CO_2 ambiente y temperatura ambiente (círculos abiertos y línea discontinua fina), CO_2 ambiente y temperatura 4°C mayor (cuadrados abiertos y línea continua fina), CO_2 elevado y temperatura ambiente (círculos rellenos y línea discontinua) y CO_2 elevado y temperatura $+4^{\circ}\text{C}$ (cuadrados rellenos y línea continua gruesa). La significación estadística de las diferencias entre líneas de regresión está dada por el análisis de paralelismo de la Tabla 4.2.2. Los puntos representan medias \pm error estándar (barras verticales) de datos reales y las líneas son las curvas de regresión ajustadas a dichos datos.

Cuando se utilizaron 135 o 330 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 de medida se observaron diferencias significativas debidas al CO_2 de crecimiento, tanto en la elevación de la curva de respuesta de la fotosíntesis a la temperatura como en los parámetros que definen la pendiente de esa respuesta (Fig. 4.2.3). Como se ha indicado, la elevación de las curvas fue menor en las plantas que crecieron en CO_2 elevado, pero la fotosíntesis aumentó con la temperatura hasta máximos desplazados entre 5 y 10 $^{\circ}\text{C}$ más respecto a las plantas crecidas en CO_2 ambiente, esto es, desde unos 25 $^{\circ}\text{C}$ para las plantas de CO_2 ambiente hasta unos 30 $^{\circ}\text{C}$ (35 $^{\circ}\text{C}$ en las medidas con 330 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2) para las de CO_2 elevado. En medidas con 135 y 330 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , el crecimiento con 4°C

más de temperatura no tuvo influencia en las plantas que crecieron con el CO₂ igual al actual en la atmósfera, de forma que con las dos concentraciones de CO₂ de medida se obtuvo una curva común para ambas temperaturas de crecimiento (Tabla 4.2.2). En contraste, en las plantas que crecieron en CO₂ elevado, las plantas que crecieron con temperatura más alta tuvieron una curva de respuesta de la fotosíntesis a la temperatura con mayor elevación que las plantas que crecieron en temperatura ambiente.

4.2.2. Influencia de la conductancia (g_s)

Las medidas que se realizaron de intercambio gaseoso, también dan los valores de la conductancia de los estomas y por tanto de cómo se comportan éstos durante las medidas y de su posible influencia en la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura por su relación directa con el CO₂ intercelular.

Los valores de conductancia de los estomas fueron más bajos en 2002 que en 2003 (Fig. 4.2.4), mostrando que las plantas estuvieron sometidas a mayor déficit hídrico el primer año. En 2002, La respuesta de la conductancia a la temperatura fue similar para las dos concentraciones de CO₂ de medida. En general, la conductancia, disminuyó rápidamente desde un máximo a la temperatura más baja (20 °C) hasta los 30 °C y a partir de esta temperatura se hizo estable o disminuyó levemente. Como excepción, las plantas de CO₂ bajo y temperatura ambiente tuvieron un máximo, no en la temperatura mas baja, sino entre 25° C (para 200 μmol mol⁻¹ de CO₂ de medida) y 30° C (para 1000 μmol mol⁻¹ de CO₂ de medida).

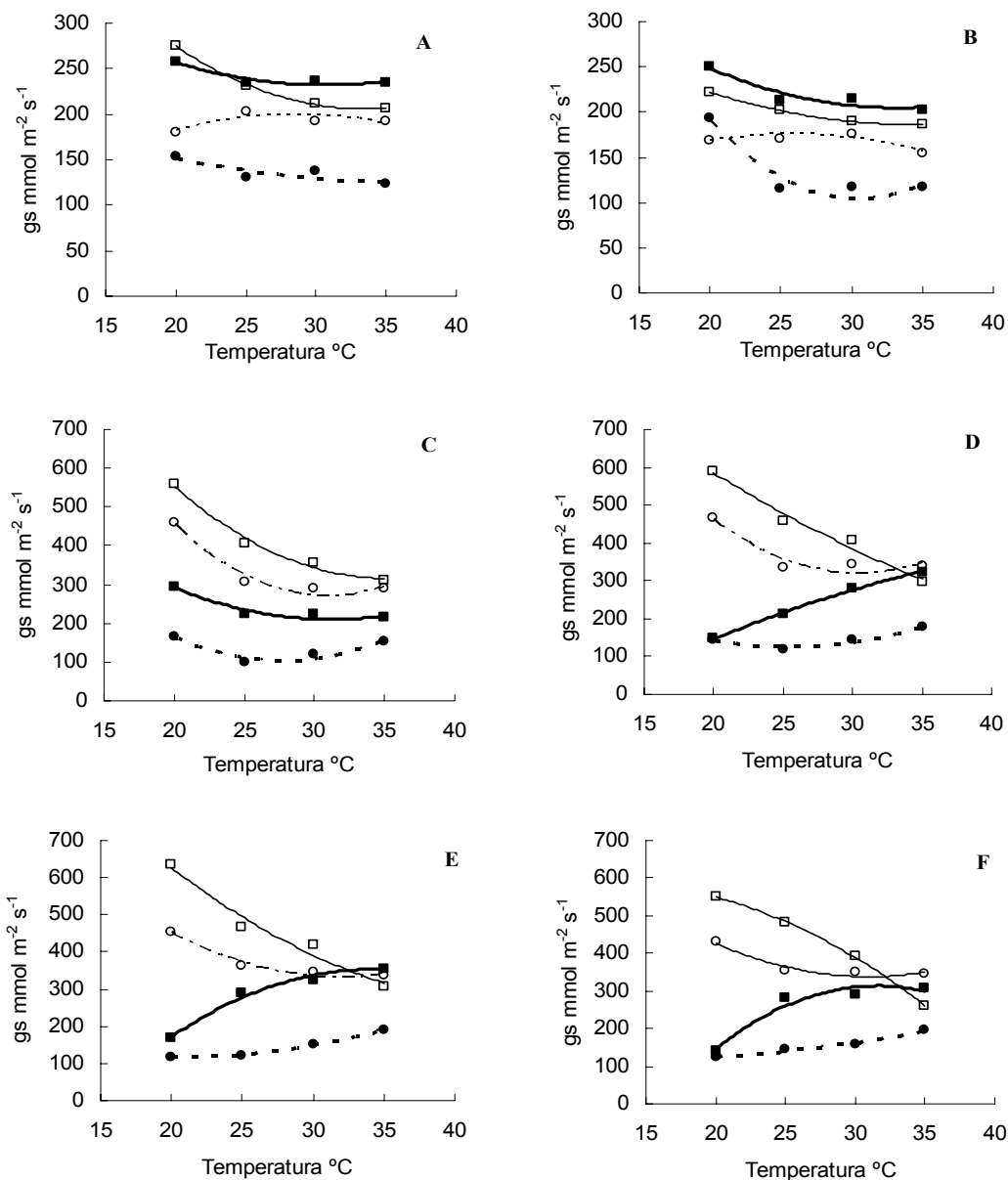


Fig. 4.2.4. Respuesta de la conductancia a la temperatura, medida a 1000 (A), y 200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 (B) en 2002 y a 60 (C), 135 (D), 225 (E) y 330 (F) $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 en 2003, para plantas crecidas en CO_2 ambiente y temperatura ambiente (círculos abiertos y línea continua fina), CO_2 ambiente y temperatura 4 $^{\circ}\text{C}$ mayor (cuadrados abiertos y línea continua fina), CO_2 elevado y temperatura ambiente (círculos rellenos y línea discontinua) y CO_2 elevado y temperatura + 4 $^{\circ}\text{C}$ (cuadrados rellenos y línea continua gruesa). Los puntos representan datos reales y las líneas son curvas ajustadas a dichos datos.

El CO_2 de crecimiento no pareció influir específicamente en la conductancia. En cambio, la temperatura de crecimiento sí pareció tener un papel importante en la misma. Las plantas que crecieron con 4 $^{\circ}\text{C}$ más de temperatura tuvieron valores mayores de conductancia, independientemente de cual fuera su CO_2 de crecimiento. Esta diferencia fue más evidente cuando las plantas crecieron en CO_2 elevado.

En 2003, la conductancia de los estomas fue generalmente mayor en plantas de CO₂ ambiente que de CO₂ elevado, con todas las concentraciones de CO₂ de medida del intercambio gaseoso (Fig. 4.2.4). Por su parte, la temperatura de crecimiento aumentó la conductancia con ambos niveles de CO₂ de crecimiento. La respuesta de la conductancia a la temperatura de medida fue negativa con CO₂ ambiente durante el crecimiento, pero positiva con CO₂ elevado, con la excepción en este último caso de las medidas realizadas con 60 μmol mol⁻¹ de CO₂.

4.2.3. Relaciones A-C_i

Las respuestas de la fotosíntesis a la temperatura con concentraciones de CO₂ subambientales pueden deberse a la actividad Rubisco. Para examinar esta posibilidad, en 2003 se analizó primeramente el efecto de la temperatura en la relación entre fotosíntesis y concentración de CO₂ en los espacios intercelulares de las hojas (A-C_i), cuya pendiente inicial es la eficiencia de la carboxilación, dependiente de la actividad Rubisco.

La Figura 4.2.5 muestra que las respuestas de la fotosíntesis a concentraciones de CO₂ en los espacios intercelulares inferiores a, aproximadamente, 250 μmol mol⁻¹ fueron lineales. Dentro de cada una de las cuatro combinaciones de CO₂ y temperatura de crecimiento, la comparación de las rectas de relación A-C_i para las cuatro temperaturas mediante análisis de paralelismo indica que fueron diferentes tanto la ordenada en el origen, que representa la respiración (oscura y fotorrespiración), como la pendiente de la recta, indicativa de la eficiencia de la carboxilación (Tabla 4.2.3).

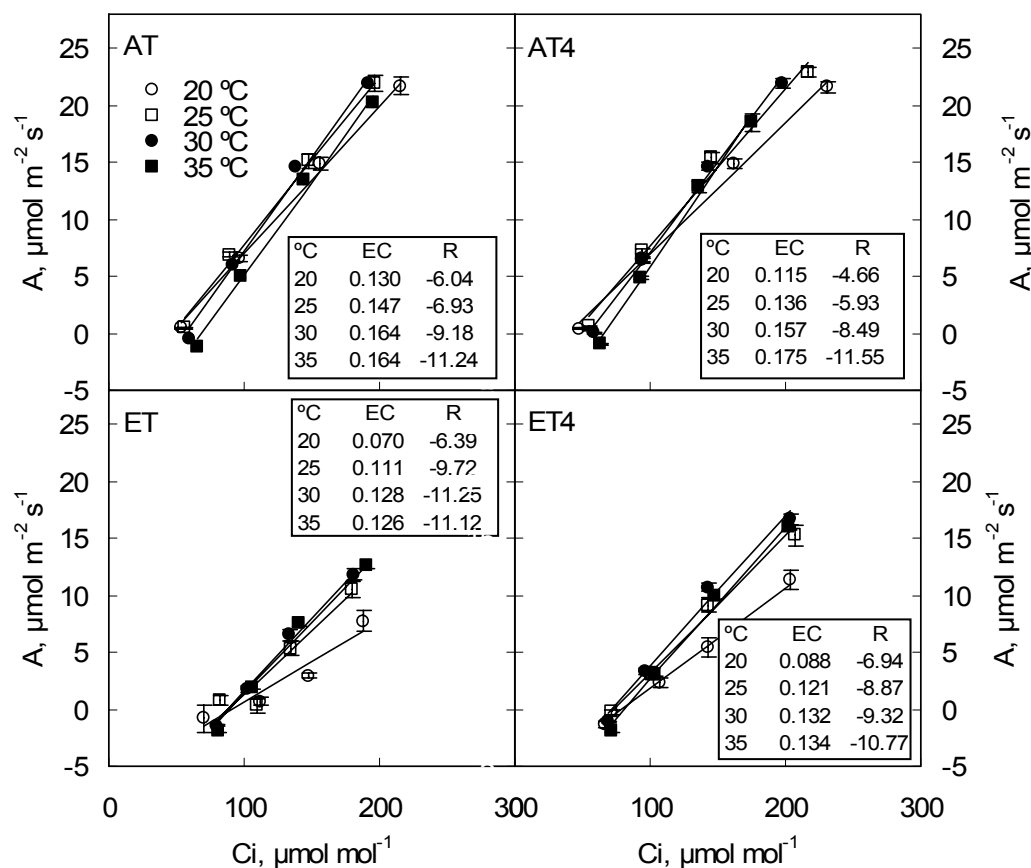


Fig 4.2.5. Respuesta de la fotosíntesis a la concentración intercelular de CO₂ a varias temperaturas en plantas crecidas en CO₂ ambiente (A) y elevado (E) con temperatura ambiente (T) y 4 °C más alta (T4) en 2003. EC (eficiencia de la carboxilación) y R (respiración) son la pendiente y la ordenada en el origen, respectivamente, de las rectas de regresión. Cada punto es la media de cuatro repeticiones. Las barras verticales representan el error estándar de la media.

Ambos parámetros aumentaron al hacerlo la temperatura hasta 30 o 35 °C. De igual forma, las comparaciones de los cuatro tratamientos a cada una de las temperaturas de medida mostraron que la eficiencia de la carboxilación fue significativamente menor en las plantas crecidas en CO₂ elevado.

Tabla 4.2.3. Razones de varianza (r.v.) y probabilidades (F) en el análisis de varianza del paralelismo de las rectas de respuesta de la fotosíntesis al CO₂ intercelular en 2003 (Fig. 4.2.5). Se comparan las respuestas de la fotosíntesis a 20, 25, 30 y 35 °C dentro de las cuatro combinaciones de crecimiento en CO₂ ambiente (A) y elevado (E) con temperatura ambiente (T) y 4 °C mayor (T4), así como las respuestas de estas cuatro combinaciones de tratamientos para cada una de las cuatro temperaturas.

		Curva común		Curvas paralelas		Curvas separadas	
		r.v.	F	r.v.	F	r.v.	F
AT	Temp.	4071.52	<0.001	18.11	<0.001	13.44	<0.001
AT4	Temp	12044.48	<0.001	28.18	<0.001	91.74	<0.001
ET	Temp	1161.67	<0.001	20.48	<0.001	20.73	<0.001
ET4	Temp	3953.36	<0.001	54.67	<0.001	37.75	<0.001
20 °C	Trat	2615.03	<0.001	264.09	<0.001	33.42	<0.001
25 °C	Trat	3513.57	<0.001	239.16	<0.001	10.45	<0.001
30 °C	Trat	5828.74	<0.001	292.14	<0.001	20.71	<0.001
35 °C	Trat	4999.29	<0.001	197.46	<0.001	30.4	<0.001

4.2.4. Velocidad máxima de carboxilación

Para confirmar las diferencias observadas mediante los análisis de intercambio gaseoso, la respuesta de la actividad máxima (V_{cmax}) del enzima Rubisco al aumento instantáneo de temperatura se analizó *in vitro* en 2002 y a partir de las relaciones A-C_i en 2003. Como se detalla en Material y Métodos apartado 3.3.2.3, V_{cmax} se determinó en 2003 a través de la relación entre la fotosíntesis con un término, que denominamos f , que incluye el CO₂ intercelular, el punto de compensación de CO₂ en ausencia de respiración, y las constantes cinéticas de la Rubisco (Ec. 3.2), teniendo en cuenta la dependencia respecto a la temperatura de estos parámetros.

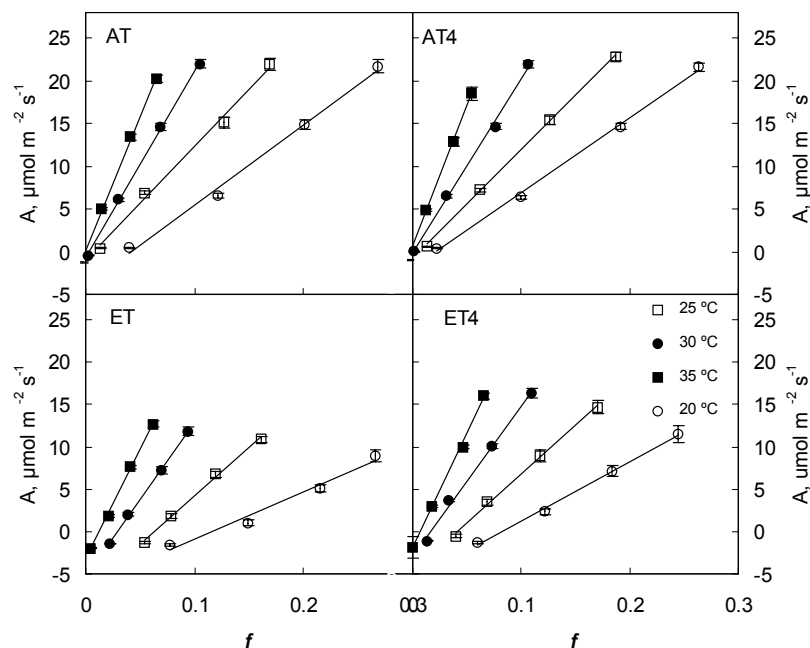


Fig 4.2.6. Relaciones de la fotosíntesis con f - $(C_i - \Gamma^*) / (C_i + K_c(1 + O/K_o))$ - a varias temperaturas en plantas crecidas en CO_2 ambiente (A) y elevado (E) con temperatura ambiente (T) y 4 °C mayor (T4) en 2003. Las pendientes de estas rectas (V_{cmax}) se incluyen en la Tabla 3.2.4. La expresión en el eje de abscisas se ha computado con los parámetros de respuesta a la temperatura de sus términos. Cada punto es la media de cuatro repeticiones. Las barras verticales representan el error estándar de la media.

Las pendientes de las rectas de respuesta de la fotosíntesis a f (Fig. 4.2.6), con las concentraciones de CO_2 subambientales utilizadas, son los valores correspondientes de V_{cmax} , que aumentó al crecer las temperaturas de 20 a 35 °C (Tabla 4.2.4), con diferencias entre las mismas de mayor magnitud que las observadas con la eficiencia de la carboxilación (Fig. 4.2.5). El crecimiento en CO_2 elevado disminuyó significativamente V_{cmax} (Tabla 4.2.4). Las temperaturas 4 °C mayores que las ambientales no tuvieron efecto significativo en la relación A - f en plantas crecidas en CO_2 ambiente, mientras que aumentaron la elevación (ordenada en el origen) de las rectas de regresión, y en algunas temperaturas de medida también la pendiente, en CO_2 elevado.

Tabla 4.2.4. Razones de varianza (r.v.) y probabilidades (F) en el análisis de varianza del paralelismo de las rectas de respuesta de la fotosíntesis a f (Fig. 3.2.6). Se comparan las respuestas de la fotosíntesis a 20, 25, 30 y 35 °C dentro de las cuatro combinaciones de crecimiento en CO₂ ambiente (A) y elevado (E) con temperatura ambiente (T) y 4 °C mayor (T4), así como las respuestas de estas cuatro combinaciones de tratamientos para cada una de las cuatro temperaturas. También se compara el efecto de la temperatura de crecimiento (T – T4) en plantas crecidas en las dos concentraciones de CO₂. Las respuestas se midieron con concentraciones de 60, 135, 225 y 330 μmol mol⁻¹ de CO₂ en el aire.

		Curva común		Curvas paralelas		Curvas separadas	
		r.v.	F	r.v.	F	r.v.	F
AT	Temp.	2131.12	<0.001	413.55	<0.001	224.01	<0.001
AT4	Temp	7056.1	<0.001	848.89	<0.001	646.7	<0.001
ET	Temp	194.05	<0.001	223.67	<0.001	108.62	<0.001
ET4	Temp	908.1	<0.001	459.99	<0.001	212.68	<0.001
20 °C	Trat	1550.91	<0.001	195.16	<0.001	21.97	<0.001
25 °C	Trat	3677.79	<0.001	261.77	<0.001	12.06	<0.001
30 °C	Trat	5481.17	<0.001	292.79	<0.001	21.92	<0.001
35 °C	Trat	4991.6	<0.001	195.47	<0.001	25.57	<0.001
A	T- T4	894.89	<0.001	0	0.94	0.4	0.53
E	T- T4	205.96	<0.001	27.18	<0.001	12.02	<0.001

V_{cmax} (Tabla 4.2.5) aumentó con la temperatura de medida en los dos años experimentales, con respuestas menores en el ensayo *in vitro* que en la medida *in vivo*, quizá debido a una disminución con el aumento de la temperatura en la solubilidad del CO₂ en la fase líquida en el ensayo *in vitro*. El análisis conjunto de los dos años experimentales incluyó las medidas entre 20 y 35 °C, dejando fuera las realizadas a 15 °C sólo el primer año. El crecimiento en CO₂ elevado disminuyó V_{cmax} , de acuerdo con las medidas de asimilación de CO₂. El análisis de la varianza para los dos años (Tabla 4.2.1) indica que temperatura y CO₂ de crecimiento interactuaron sobre V_{cmax} , de forma

que las temperaturas más calidas no tuvieron efecto significativo sobre V_{cmax} en CO_2 ambiente, mientras que aumentaron V_{cmax} en CO_2 elevado. La temperatura de medida tuvo un efecto muy significativo en V_{cmax} , que respondió curvilínealmente a su aumento. El crecimiento en CO_2 elevado modificó la respuesta de V_{cmax} a la temperatura, como muestra el componente lineal significativo de la interacción CO_2 -temperatura de medida.

Tabla 4.2.5. V_{cmax} de la Rubisco (\pm error estándar de la media, $N=4$, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en hojas últimas de trigo crecido en CO_2 ambiente (A) y elevado (E) con temperatura ambiente (T) y 4 °C mayor (T4), en dos años sucesivos. V_{cmax} se midió *in vitro* el primer año de experimento y a partir de la respuesta A-Ci (intercambio gaseoso) el segundo año.

Año	CO ₂	Temp.	Temperatura de medida, °C							
			20		25		30		35	
2002	A	T	110.3	(2.0)	148	(2.1)	222.2	(5.5)	271.4	(6.0)
		T4	103.3	(3.5)	137.1	(5.9)	199.1	(11.8)	267.6	(2.7)
	E	T	77.9	(1.8)	107.6	(3.2)	157.8	(2.1)	201.2	(4.0)
		T4	81.2	(2.3)	114.6	(4.5)	167.3	(8.2)	214.6	(6.5)
2003	A	T	92.9	(7.9)	130.4	(13.1)	215.7	(19.5)	316	(23.1)
		T4	86.9	(1.4)	126.3	(5.2)	203.4	(5.4)	280.6	(38.4)
	E	T	53.4	(18.4)	89.6	(19.9)	177.7	(16.8)	253.4	(27.4)
		T4	65.3	(12.9)	117	(15.7)	179.5	(15.4)	266.6	(9.4)

Las funciones de Arrhenius ajustadas a los datos de V_{cmax} (Fig. 4.2.7) mostraron mayor interceptación – actividad Rubisco a 25 °C (V_{25}) – en plantas crecidas en CO_2 ambiente que elevado (modelo con curvas paralelas, $P<0.001$, Tabla 4.2.6), en conformidad con las medidas de asimilación de CO_2 . En contraste, la pendiente de estas funciones (energía de activación), indicativa de la respuesta a la temperatura, fue significativamente mayor en CO_2 elevado (modelo con curvas separadas significativo, $P=0.079$, Tabla 4.2.6).

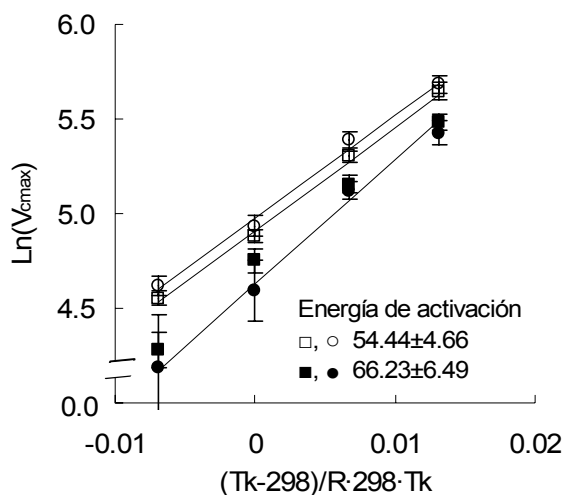


Fig 4.2.7. Funciones de Arrhenius para la respuesta a la temperatura de la velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco, medida en dos años sucesivos, en plantas crecidas en CO₂ ambiente y temperatura ambiente (círculos abiertos), CO₂ ambiente y temperatura 4 °C mayor (cuadrados abiertos), CO₂ elevado y temperatura ambiente (círculos rellenos) y CO₂ elevado y temperatura + 4 °C (cuadrados rellenos). La significación de las diferencias entre las funciones de Arrhenius está dada por el análisis de paralelismo (véase la Tabla 4.2.6). El eje de las x normalizado a 25 °C es $(T_k - 298) / (R \cdot 298 \cdot T_k)$, donde R es la constante molar de los gases y T_k la temperatura absoluta de la hoja. Las intercaptaciones de las líneas de regresión son los logaritmos de V_{cmax} a 25 °C, y las pendientes de estas líneas son las energías de activación.

Así, la línea de mejor ajuste para estas plantas crecidas en CO₂ elevado fue más creciente que la de las plantas de CO₂ ambiente. Las temperaturas más cálidas durante el crecimiento tuvieron un ligero, pero significativo, efecto negativo en la actividad Rubisco a 25 °C en CO₂ ambiente. El pequeño efecto positivo de la temperatura más cálida en las funciones de Arrhenius para las plantas en CO₂ elevado no fue significativo, en contraste con los resultados del análisis de varianza.

Tabla 4.2.6.- Razones de varianza (v. r.) y probabilidades (F) del análisis acumulativo de la varianza en el análisis de modelos paralelos para las respuestas a la temperatura de la velocidad máxima de carboxilación del enzima Rubisco (V_{cmax}). Medidas en últimas hojas de trigo crecido en $370 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ o $700 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ combinados con temperatura ambiente o ambiente+4 °C. (n.s.) significa no significativo estadísticamente. Análisis comparativos de todos los tratamientos (Trat), de las dos concentraciones de CO_2 (CO_2), de las dos temperaturas (Temp), y de las dos temperaturas en CO_2 de crecimiento ambiente (AmbTemp) y elevado (ElevTemp).

		Curva común		Curvas paralelas		Curvas separadas	
		r.v.	F	r.v.	F	r.v.	F
Vcmax	Trat	351.43	(<.001)	14.12	(.001)	1.73	(ns)
	CO ₂	340.94	(<.001)	35.54	(<.001)	3.13	(0.079)
	Temp	261.23	(<.001)	0.58	(ns)	0.99	(ns)
	AmbTemp	682.31	(<.001)	4.37	(0.041)	0.02	(ns)
	ElevTemp	125.57	(<.001)	2.76	(ns)	1.08	(ns)

**4.3. Respuesta a la temperatura de los
parámetros de un modelo de la fotosíntesis en
plantas crecidas en CO₂ ambiente y elevado**

4.3.1. Punto de compensación para el CO₂ y respiración

La Figura 4.3.1 muestra las medidas de respuesta A/C_c para determinar Γ^* y R_d a las dos temperaturas extremas de medida en una hoja dada. La figura apunta a un aumento de ambos parámetros con la temperatura, como se muestra en la Tabla 4.3.1.

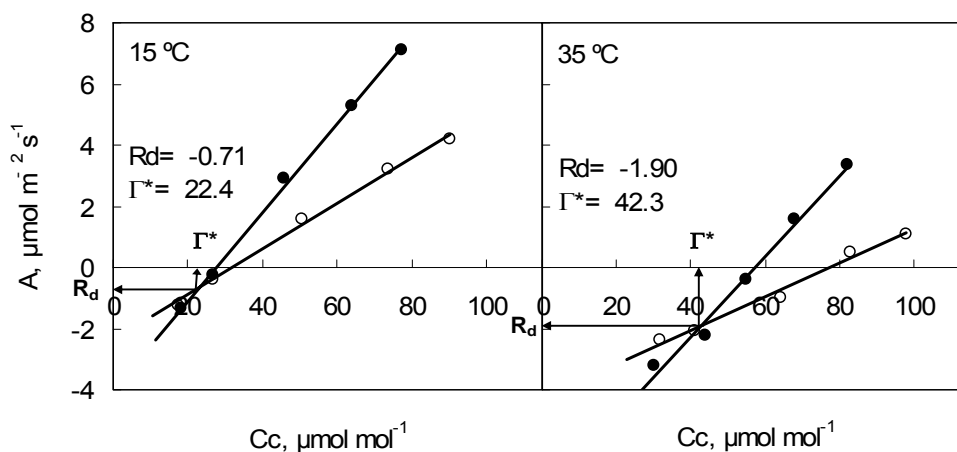


Fig 4.3.1. Relación entre la fotosíntesis (A) y la concentración de CO₂ en el cloroplasto (C_c) en el margen de concentraciones bajas de CO₂, con intensidades de luz de 1500 (●) y 200 (○) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Γ^* y R_d son las coordenadas del punto de intersección de las dos rectas y representan el punto de compensación de CO₂ y la respiración mitocondrial en la luz, respectivamente.

El CO₂ elevado aumentó la respiración en la luz (Tabla 4.3.1). Sin embargo, la magnitud de las fugas de difusión del CO₂ en la cámara foliar afectó fuertemente a la precisión de las estimaciones de R_d . El punto de compensación de CO₂ (Tabla 4.3.1) fue ligera, pero significativamente menor (3.8 % como promedio) en CO₂ elevado. El aumento de la temperatura de medida aumentó Γ^* similarmente en plantas crecidas en CO₂ ambiente y elevado.

Tabla 4.3.1. Efectos del CO₂ de crecimiento y la temperatura de medida en los parámetros de la fotosíntesis (\pm error estándar de la media) en hojas últimas de trigo. Los parámetros se obtuvieron a partir de las respuestas de la fotosíntesis a la concentración intercelular de CO₂. Las unidades son $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Γ^*) o $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (otros parámetros).

		CO ₂ de crecimiento		Temperatura de medida, °C								Probabilidad		
				15	20	25	30	35	CO ₂	Temp.	CO ₂ x Temp.			
R _d	Ambiente	0.25	(0.03)	0.45	(0.21)	0.00	(0.34)	0.75	(0.28)	1.56	(0.12)	<.001	<.001	0.08
	Elevado	0.25	(0.13)	0.77	(0.14)	0.31	(0.15)	1.82	(0.11)	2.07	(0.13)			
Γ^*	Ambiente	23.69	(0.96)	26.83	(0.81)	32.00	(0.59)	37.17	(0.46)	42.34	(0.64)	0.05	<.001	0.84
	Elevado	22.30	(1.56)	26.78	(1.25)	31.10	(0.97)	35.34	(0.95)	40.26	(0.93)			
V _{cmax}	Ambiente	44.77	(1.61)	53.78	(2.41)	93.16	(5.33)	125.48	(5.08)	183.04	(7.72)	<.001	<.001	0.002
	Elevado	39.96	(2.97)	68.32	(1.91)	108.70	(12.14)	159.22	(6.34)	240.82	(15.13)			
J _{max}	Ambiente	158.83	(2.87)	204.20	(7.03)	258.45	(6.07)	290.63	(7.61)	312.49	(10.97)	0.08	<.001	<.001
	Elevado	151.57	(5.05)	199.81	(6.89)	235.04	(11.53)	326.18	(11.05)	368.16	(19.73)			
J _{max} /V _{cmax}	Ambiente	3.57	(0.13)	3.83	(0.21)	2.82	(0.15)	2.35	(0.15)	1.71	(0.05)	0.004	<.001	0.01
	Elevado	3.87	(0.23)	2.93	(0.10)	2.31	(0.29)	2.06	(0.07)	1.54	(0.08)			
A _{max}	Ambiente	33.87	(0.63)	43.23	(1.62)	53.45	(1.13)	59.89	(1.39)	64.02	(2.12)	0.05	<.001	<.001
	Elevado	32.40	(1.10)	42.64	(1.49)	48.99	(2.42)	68.06	(2.23)	74.69	(3.40)			

4.3.2. Velocidades máximas de carboxilación, transporte de electrones y fotosíntesis

El cálculo de la velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco, V_{cmax} , para una misma hoja a dos temperaturas distintas se muestra en la Figura 4.3.2, que permite observar el aumento de este parámetro a temperatura alta. V_{cmax} aumentó con las temperaturas más cálidas y con el CO_2 elevado (23 %), aunque el último efecto se invirtió a 15 °C (Tabla 4.3.1). La interacción $\text{CO}_2 \times$ temperatura indicó que el crecimiento en CO_2 elevado estimuló la respuesta de V_{cmax} a la temperatura.

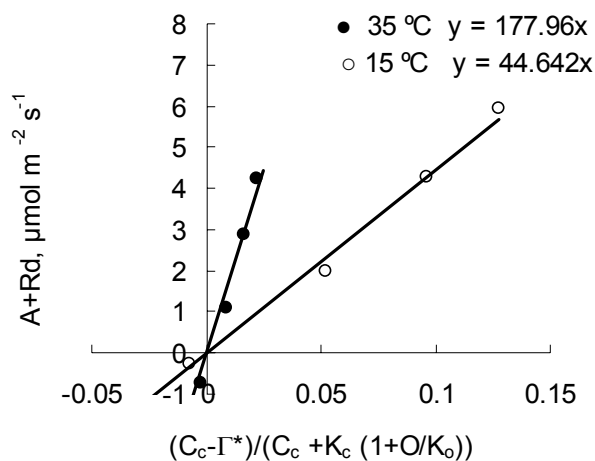


Fig 4.3.2 Ajuste para dos temperaturas de la función de la velocidad de carboxilación limitada por la actividad Rubisco: $A+R_d = V_{\text{cmax}}(C_i - \Gamma^*) / (C_i + K_c (1 + O/K_o))$. La actividad Rubisco máxima (V_{cmax}) es la pendiente de la recta de regresión.

Las estimaciones de la velocidad máxima de transporte de electrones (J_{max} , Fig. 4.3.3), a partir de la relación A/C_c , muestran que ésta aumentó también con la temperatura (Tabla 4.3.1). Comparado con el CO_2 ambiente, el CO_2 elevado tendió a disminuir este parámetro en el rango de temperaturas de 15 a 25 °C y lo aumentó significativamente a 30 y 35 °C; el aumento de J_{max} con la temperatura fue, por tanto, mayor en CO_2 elevado que ambiente. La razón $J_{\text{max}}/V_{\text{cmax}}$ disminuyó con la temperatura (Tabla 4.3.1). El CO_2 elevado aumentó esta razón a 15 °C y la disminuyó a temperaturas más altas; por consiguiente, el CO_2 elevado estimuló la disminución de $J_{\text{max}}/V_{\text{cmax}}$ con la temperatura.

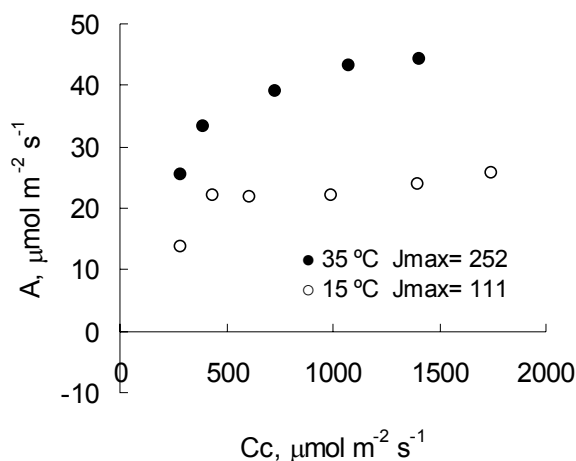


Fig 4.3.3. Respuestas de la fotosíntesis a concentraciones altas de CO_2 intercelular a dos temperaturas. Los valores de J_{max} y A_{max} se estimaron a partir de estas curvas de respuesta.

La relación A/C_c permite también determinar la velocidad de fotosíntesis saturada por la luz y el CO_2 (A_{max}) como el valor asintótico de una hipérbola rectangular. Como J_{max} , A_{max} aumentó con la temperatura (Tabla 4.3.1) y tendió a ser menor con CO_2 elevado que ambiente con temperaturas entre 15 y 25 °C, pero la diferencia se invirtió a temperaturas más altas, siendo muy significativa esta interacción del CO_2 con la temperatura.

Las curvas de respuesta de la fotosíntesis a la intensidad luminosa se utilizaron como procedimiento alternativo para calcular A_{max} y J_{max} (Fig. 4.3.4). Las respuestas al CO_2 de crecimiento y la temperatura de medida fueron similares a las encontradas con el cálculo a partir de las relaciones A/C_c . Al no alcanzarse una meseta en el valor de fotosíntesis con irradiancias altas, los valores obtenidos fueron mayores que los calculados a partir de las curvas A/C_c . Esto sugiere que la curva de respuesta a la luz puede sobreestimar estos parámetros, prefiriéndose, por tanto, los obtenidos a partir de las curvas A/C_c .

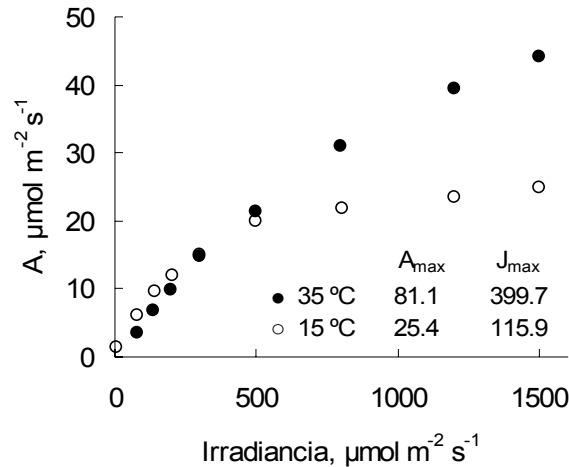


Fig 4.3.4. Respuestas de la fotosíntesis a la irradiancia a dos temperaturas. Los valores de A_{\max} y J_{\max} se estimaron alternativamente a partir de estas curvas de respuesta.

4.3.3. Respuestas de los parámetros de la fotosíntesis a la temperatura

La respuesta a la temperatura de los parámetros de la fotosíntesis en plantas que crecieron en CO_2 ambiente y elevado se examinó con funciones de Arrhenius (Fig. 4.3.5), que permiten comparar los parámetros a una temperatura de referencia de 25 °C y estimar las energías de activación de los mismos. Los valores ajustados a 25 °C de la respiración en la oscuridad fueron mayores, y los del punto de compensación de CO_2 fueron similares, en CO_2 elevado que ambiente (Tabla 4.3.2). V_{cmax} a 25 °C fue mayor en CO_2 elevado que ambiente, mientras que J_{\max} y A_{\max} a 25 °C no fueron significativamente diferentes entre concentraciones de CO_2 . Las pendientes de las funciones de Arrhenius (energías de activación, H) para R_d y Γ^* no mostraron diferencias significativas debidas al CO_2 (Tabla 4.3.2). En cambio, las energías de activación correspondientes a V_{cmax} , J_{\max} y A_{\max} fueron más altas en CO_2 elevado que ambiente, lo que indica que el enriquecimiento en CO_2 aumentó la respuesta a la temperatura de estos parámetros.

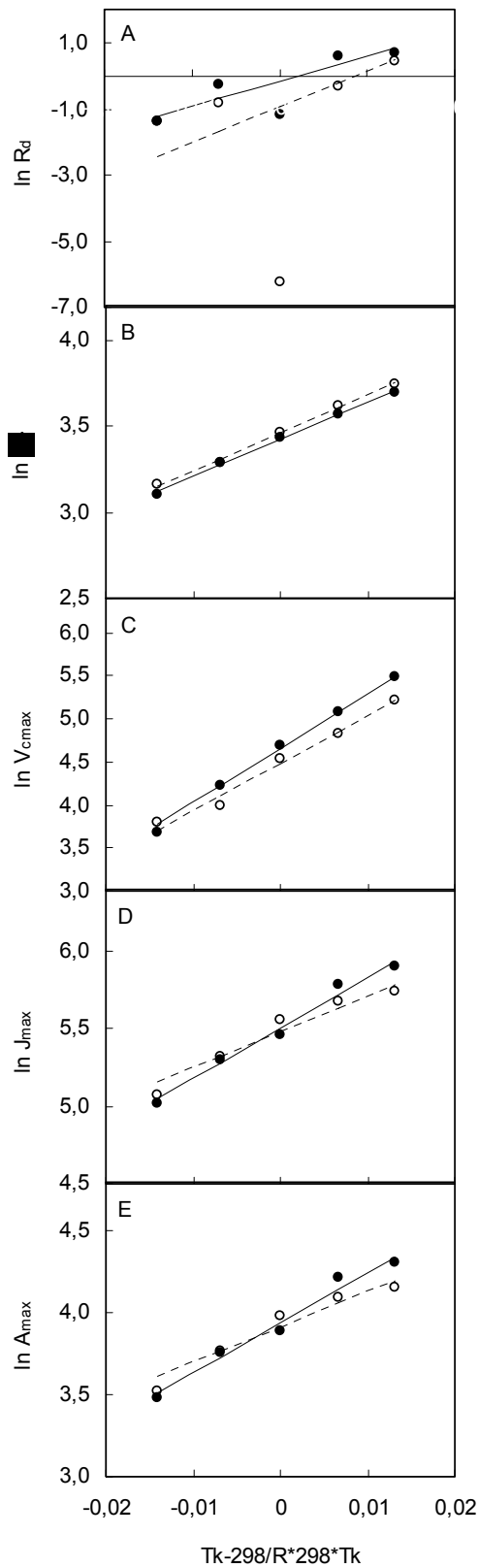


Fig 4.3.5. Funciones de Arrhenius para los parámetros de la fotosíntesis en plantas crecidas en CO₂ ambiente (370 μmol mol⁻¹, símbolos abiertos y líneas punteadas) y elevado (700 μmol mol⁻¹, símbolos cerrados, líneas sólidas). Los parámetros son: (A) respiración mitocondrial en la luz (Rd); (B) punto de compensación para el CO₂ (Γ*); (C) velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco (V_{cmax}); (D) velocidad máxima de transporte de electrones (J_{max}); y (E) velocidad de fotosíntesis saturada por el CO₂ y la luz (A_{max}). Las funciones de Arrhenius son de la forma $\text{Parámetro} = \text{Parámetro}_{25} \exp(H \cdot (T_k - 298) / R \cdot 298 \cdot T_k)$, donde Parámetro_{25} es el valor del parámetro a 25 °C, y H es la energía de activación (kJ mol⁻¹). Cada punto es la media de seis plantas repetidas.

Tabla 4.3.2. Estimaciones (\pm error estándar de la media) del modelo de Arrhenius para la respuesta a la temperatura de los parámetros de intercambio gaseoso en plantas de trigo crecidas en $370 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (CO_2 ambiente) y $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (CO_2 elevado) en una cámara de crecimiento. P es la probabilidad en el análisis de la varianza para los efectos de la concentración de CO_2 .

	CO ₂ de crecimiento	Valor a 25 °C	H (kJ mol ⁻¹)
R _d ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Ambiente	0.40 (0.11)	108 (23.0)
	Elevado	0.86 (0.13)	76 (11.6)
	P	0.02	0.25
Γ^* ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	Ambiente	31.8 (0.54)	22.1 (1.67)
	Elevado	30.7 (1.08)	21.4 (2.06)
	P	0.35	0.80
V _{cmax} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Ambiente	88.3 (1.08)	55.3 (2.52)
	Elevado	105.1 (5.30)	63.2 (2.78)
	P	0.01	0.06
J _{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Ambiente	240.4 (5.00)	23.1 (9.02)
	Elevado	246.0 (1.38)	32.6 (1.18)
	P	0.60	>0.001
A _{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Ambiente	50.1 (0.96)	21.7 (1.31)
	Elevado	51.5 (1.83)	30.6 (0.87)
	P	0.5	>0.001

4.3.4. Curvas de respuesta A/C_c

Los parámetros de la fotosíntesis que se han calculado, se utilizaron en el modelo de la fotosíntesis de Farquhar et al. (1980) para examinar el efecto de la concentración de CO_2 de crecimiento en la respuesta de la fotosíntesis a la concentración cloroplástica de CO_2 y la temperatura (Fig. 4.3.6). Los datos modelizados se ajustaron estrechamente a los determinados experimentalmente, excepto, a ciertas temperaturas, en la medida con $370 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 . En el protocolo de medida, la concentración de CO_2 bajó desde 115 hasta $12 \mu\text{mol mol}^{-1}$ antes de aumentar hasta 370 y más. Un cambio en la activación de la Rubisco con el aumento brusco del CO_2 podría explicar el distanciamiento entre el valor medido y la curva de respuesta. Para todas las temperaturas de medida, hubo un aumento de la fotosíntesis al aumentar la concentración intercelular de CO_2 , pero este aumento fue mayor con temperaturas de medida más altas. La Rubisco limitó la fotosíntesis en el margen de concentraciones bajas de CO_2 , y el transporte de electrones lo hizo con concentraciones más altas. La transición entre fotosíntesis limitada por la Rubisco y por la regeneración de RuBP (transporte de electrones) ocurrió con mayores valores de CO_2 en el cloroplasto para plantas crecidas en CO_2 ambiente ($275\text{-}375 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2) que elevado ($200\text{-}320 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2) y aumentó con la temperatura de medida. El crecimiento en CO_2 elevado sólo cambió ligeramente la respuesta al CO_2 de la fotosíntesis limitada por la Rubisco a 15°C y la aumentó a temperaturas más cálidas. Por su parte, el CO_2 elevado disminuyó la respuesta de la fotosíntesis limitada por la regeneración de RuBP a la concentración de CO_2 en el cloroplasto en el rango $15\text{-}25^\circ\text{C}$, pero la aumentó a temperaturas más altas.

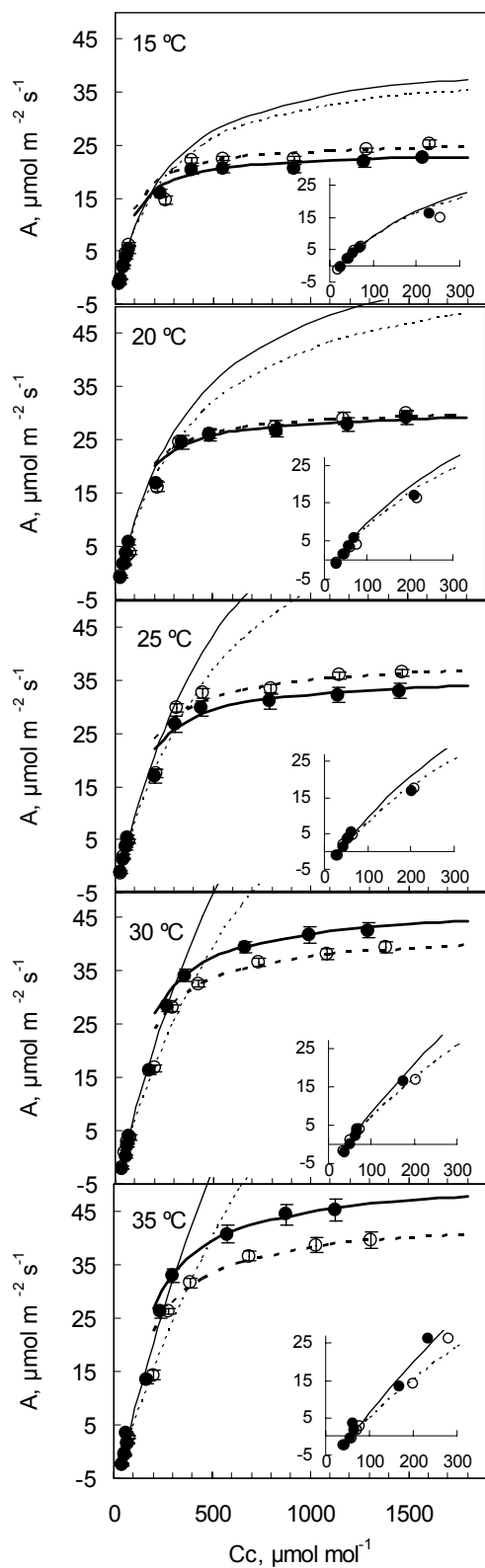


Fig 4.3.6. Respuestas de la fotosíntesis al CO_2 en el cloroplasto a varias temperaturas en plantas crecidas en CO_2 ambiente ($370 \mu\text{mol mol}^{-1}$, símbolos abiertos y líneas punteadas) y elevado ($700 \mu\text{mol mol}^{-1}$, símbolos cerrados, líneas sólidas). Los símbolos corresponden a los datos medidos y las líneas a las velocidades de fotosíntesis limitada por la actividad Rubisco (líneas delgadas) y por la regeneración de RuBP (líneas gruesas), calculadas con el modelo de Farquhar et al. (1980). Las figuras insertadas muestran los tramos iniciales de respuesta. Cada punto es la media de seis plantas \pm error estándar.

4.3.5. Curvas de respuesta a la temperatura

La respuesta de la fotosíntesis a la temperatura fue negativa con concentraciones bajas de CO_2 en el aire (Fig. 4.3.7) y se hizo positiva progresivamente al aumentar el CO_2 , como cabe esperar del aumento en la fotorrespiración con la temperatura y su inhibición gradual con el aumento del CO_2 (Long 1991).

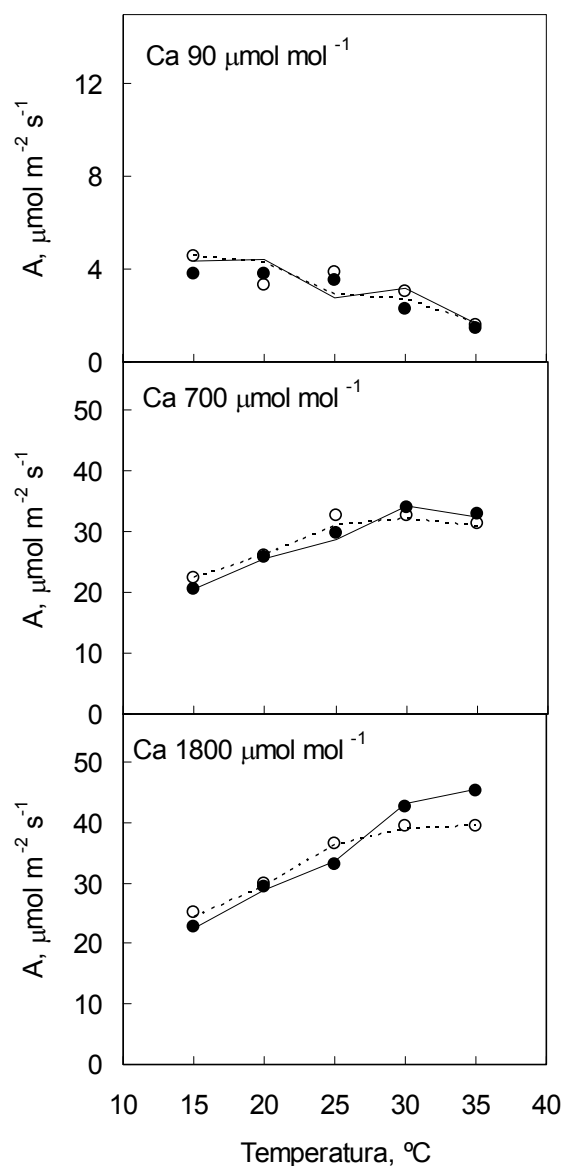


Fig 4.3.7. Respuestas medidas (símbolos) y modelizadas (líneas) de la fotosíntesis a la temperatura con concentraciones de CO_2 en el aire correspondientes a la limitación por Rubisco ($90 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$) y por regeneración de RuBP (700 y $1800 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$) en hojas últimas de trigo crecido en CO_2 ambiente ($370 \mu\text{mol mol}^{-1}$, símbolos abiertos y líneas punteadas) y elevado ($700 \mu\text{mol mol}^{-1}$, símbolos cerrados, líneas sólidas). Cada punto es la media de seis hojas.

Se observó un brusco aumento en la fotosíntesis de 15 a 35 °C con una concentración de CO₂ en el aire de 1800 μmol mol⁻¹ (Fig. 4.3.7). El CO₂ de crecimiento tuvo poco efecto en la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura en el rango de bajas concentraciones de CO₂. Con C_c alto, la fotosíntesis en CO₂ elevado fue menor a 15-25 °C, y mayor a 30-35 °C, que en CO₂ ambiente, lo que implica un estímulo de la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura en plantas crecidas en CO₂ elevado. Más aún, con 1800 μmol mol⁻¹ CO₂, la fotosíntesis alcanzó un máximo con alrededor de 30 °C en plantas de CO₂ ambiente, pero a temperaturas más altas en las de CO₂ elevado.



DISCUSSION

Como ya se indica en la Introducción, el cambio climático se desencadena por aumentos de CO₂, entre otros gases atmosféricos y una consecuencia de este aumento es la subida de la temperatura global del planeta. Por ello es importante estudiar cómo responden las plantas al aumento de estos dos factores (CO₂ y temperatura). En particular, la investigación de la respuesta de la fotosíntesis a estos cambios atmosféricos se justifica por ser el CO₂ sustrato de la misma y jugar la temperatura un papel regulador en la velocidad de las reacciones que la integran.

Parte de este trabajo se ha realizado con plantas que han crecido como un cultivo normal en el campo. Y con ayuda de cámaras de gradiente de temperatura (CGT), hemos creado una atmósfera simulada con una concentración de CO₂ el doble de la actual y con 4°C más de temperatura. Estas plantas se han comparado con otras cultivadas en idénticas condiciones, pero sin variar la temperatura y la concentración de CO₂ atmosférica que hay en el ambiente. De todos los procesos que integran la fotosíntesis, hemos intentado comprender cómo se comporta la fijación de CO₂ en estas condiciones.

5.1. Aclimatación de los estomas y la fotosíntesis al CO₂ y temperatura elevados.

Inicialmente se propuso estudiar cómo responde la conductancia de los estomas al aumento del CO₂ y la temperatura y en qué medida influyen estos cambios de la conductancia en la respuesta de la fotosíntesis a dichos aumentos.

La sensibilidad de los estomas al CO₂, o disminución de su apertura al cambiar la concentración de este último, se analizó en base a la respuesta de la conductancia (g_s) al aumento de CO₂ intercelular (C_i). Esta respuesta fue curvilínea y en las plantas que crecieron en CO₂ ambiente (excepto en un tratamiento en 2003) la pendiente fue negativa, pero en plantas de CO₂ elevado fue próxima a cero o incluso positiva (Figs. 4.1.2 y 4.1.3). Esto difiere del resultado de otros estudios en los que se han encontrado relaciones negativas entre g_s y C_i tanto en CO₂ ambiente como elevado (Šantrůček & Sage 1996; Lodge et al. 2001). Como Morison (1998) señala, generalmente g_s responde a los cambios de CO₂ con mayor lentitud que la fotosíntesis (A) y, por tanto, los tiempos de medida para las curvas g_s/C_i deberían ser mayores que con las curvas A/C_i . Aunque esto podría afectar a las curvas g_s/C_i discutidas aquí, para las que se utilizó el mismo tiempo de medida que para las curvas A/C_i , la pauta de respuesta fue claramente

diferente en plantas de CO₂ ambiente y elevado, especialmente en 2003, donde g_s fue mucho menor en CO₂ elevado que ambiente, incluso con el C_i más alto y después de 20-30 min de medida (Fig. 4.1.3). A pesar de que en este trabajo no se ha determinado la densidad de estomas, otros estudios indican que no varía o varía poco en respuesta a la concentración de CO₂ durante el crecimiento (Morison 1998). Por tanto, las diferencias en g_s entre los tratamientos de CO₂ deben atribuirse principalmente a la apertura de los estomas. Las plantas que crecieron en CO₂ elevado presentaron una sensibilidad de g_s a C_i disminuída (Figs. 4.1.2 y 4.1.3), como se ha encontrado en *Chenopodium album* (Šantrůček & Sage 1996) y *Quercus myrtifolia* (Lodge et al. 2001); esta disminución de sensibilidad se hace evidente con las pendientes de las rectas de regresión de g_s sobre el $\ln C_i$, que fueron más positivas en CO₂ elevado (Tabla 4.1.1). Pero además, en nuestro estudio, la temperatura alta (ambiente + 4 °C) también disminuyó la sensibilidad de g_s a C_i , lo que contrasta con resultados anteriores (Šantrůček & Sage 1996). Sin embargo, la temperatura no modificó el efecto del CO₂ de crecimiento en la sensibilidad de los estomas a C_i .

Como respuesta a corto plazo (respuesta directa) a la duplicación de la concentración de CO₂, la conductancia de los estomas sufrió ninguna o poca variación, con valores (Tabla 4.1.4) desde 1,07, donde no hay disminución, hasta valores de 0,87 donde sí se observa esta disminución. Esto correspondería con una variación de 0-13%. En cambio, la fotosíntesis aumentó entre un 65 y un 104 % (Tabla 4.1.6). Por otro lado, la respuesta a largo plazo al CO₂ elevado (respuesta de aclimatación) fue una disminución significativa de g_s y A (medidas con 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$), que muestra que de hecho hay una aclimatación. Una revisión bibliográfica que abarcaba 28 especies vegetales reveló que la razón $g_s(e,E)/g_s(a,A)$, es decir, el efecto neto, fue de 0.80 como promedio (Drake et al. 1997). Excepto con N alto en 2002 (1.08), el efecto neto del CO₂ elevado en g_s en el presente estudio fue mayor (0.71 en nitrógeno bajo en 2002, y 0.36 y 0.46 con nitrógeno bajo y alto, respectivamente, en 2003). La aclimatación de g_s parece ser, por tanto, de mayor magnitud en ambientes mediterráneos; por ejemplo, Bunce (2001) encontró, en el trigo y la cebada cultivados en condiciones de campo en Maryland (Estados Unidos), valores de 0.66 y 0.89, respectivamente.

La mayor disminución de g_s encontrada en 2003 que en 2002 puede atribuirse a la menor fertilización con N en 2003, que provocó síntomas de deficiencia en este nutriente con el tratamiento de N bajo. Así, la respuesta de aclimatación al CO₂ elevado de g_s y A fue claramente más pronunciada en plantas deficientes en nitrógeno (Tablas

4.1.4 y 4.1.6). Se ha visto que la carencia de nitrógeno provoca el cierre de los estomas mediado por aumentos del pH y de concentración de ácido abscísico en la savia del xilema en los primeros estadios de la deficiencia, y por factores que aún se desconocen, que operan en la misma hoja, después de una deficiencia de N prolongada (Dodd et al. 2003). Estos factores pueden intervenir en la modificación de los efectos del CO₂ en g_s causada por el nitrógeno. En otras especies la aclimatación de la fotosíntesis aumentó también con un suministro reducido de N (Nakano et al. 1997; Rogers et al. 1998; Harmens et al. 2000), pero este nutriente no tuvo, en cambio, efecto en la aclimatación fotosintética de 13 especies pratenses (Lee et al. 2001), y añadiendo N en proporción directa a la velocidad de crecimiento de la planta, no se encontró aclimatación al CO₂ elevado en plantas con suministro bajo de nitrógeno (Farage et al. 1998). Pudiera ser que la aclimatación relativa de g_s y A al CO₂ elevado depende de la concentración foliar de N. Hasta ahora, no está claro si la relación A-nitrógeno foliar resulta afectada por el CO₂ de crecimiento (Peterson et al. 1999), ya que no hay comparaciones directas con un margen amplio de aplicaciones de N. Pero nuestros datos sobre las relaciones de A y g_s con la concentración de clorofila en 2003 (Fig. 4.1.7) sugieren que hay una relación única para las plantas que crecieron en CO₂ ambiente y elevado. De modo que según nuestros datos, la concentración de CO₂ de crecimiento no afectaría a las relaciones de A y g_s con la concentración de nitrógeno foliar.

En el trigo y la cebada, la respuesta directa de A al CO₂ (Bunce 1998), y el efecto neto de éste sobre g_s (Bunce 2000b) aumentaron con la temperatura, pero se necesita más información sobre cómo afecta la temperatura a la respuesta a largo plazo, o de aclimatación, de A al CO₂ elevado. En nuestros experimentos, las temperaturas más cálidas no afectaron a la respuesta de aclimatación de g_s al CO₂ elevado, mientras que la respuesta de A sólo aumentó con la temperatura con N bajo en 2003, pero disminuyó con N alto en los dos años. Esta respuesta diferencial de g_s y A sugiere que la alteración de la aclimatación de A al CO₂ elevado a temperatura ambiente + 4 °C no estuvo mediada por cambios en la apertura de los estomas, sino más bien por las reacciones en el mesófilo.

El estudio de la razón C_i/C_a puede proporcionar información sobre la respuesta de los estomas a los cambios en la concentración de CO₂ del aire y sobre la difusión de los gases hacia el interior de la hoja. Medida con 700 μmol mol⁻¹ de CO₂, la razón C_i/C_a fue similar en plantas crecidas con las dos concentraciones de CO₂ en 2002 (0.48 de media), pero fue menor en CO₂ elevado (0.58) que ambiente (0.68) en 2003. Otros

estudios han mostrado razones similares, próximas a 0.7, en CO₂ ambiente y elevado (Tuba et al. 1994; Drake et al. 1997; Lodge et al. 2001; Ainsworth et al. 2003), lo que es indicativo de un acoplamiento entre los estomas y el mesófilo (Morison 1998). La razón C_i/C_a parece depender fuertemente de g_s , como muestra la relación estrecha entre estos dos parámetros (Fig. 4.1.5); por tanto, los menores valores de C_i/C_a observados en 2002 y en CO₂ elevado en 2003 pueden explicarse por los valores más bajos de g_s , que disminuyeron la difusión del CO₂ al interior de la hoja. Por otra parte, la disminución de C_i/C_a en CO₂ elevado en 2003 sería un argumento en contra de la aclimatación paralela de los estomas y el mesófilo.

La medida en que la fotosíntesis está regulada por la difusión del CO₂ hasta el cloroplasto se valoró estudiando la limitación de la fotosíntesis por parte de los estomas (Fig. 4.1.4). Esta limitación fue similar en CO₂ ambiente y elevado en 2002 (media de 32 % estimada con 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ en la emergencia de la espiga), pero fue mayor en CO₂ elevado (26.7 % de media) que ambiente (8.3 %) en 2003. Estas diferencias en 2003 reflejaron las diferencias en la razón C_i/C_a y en g_s encontradas en ese mismo año. Debe mencionarse que en 2003 las plantas que crecieron a temperatura más alta y con más N tuvieron la g_s (Tabla 4.1.2) y la razón C_i/C_a (0.74) más altas entre las plantas en CO₂ elevado, y presentaron una limitación estomática baja (14.7 %).

La respuesta de aclimatación de A (Tabla 4.1.6) tuvo una correlación alta con la respuesta de aclimatación de g_s ($r=0.88$, $N=8$). Además se encontró una misma relación entre A y g_s (modelo de Ball et al. 1987) – para los dos años y las dos fases de desarrollo – para las plantas de CO₂ ambiente y elevado con temperatura ambiente (Fig. 4.1.6), lo que indica que los estomas y la fotosíntesis del trigo responden en paralelo al CO₂ elevado. Se han encontrado respuestas similares en varias especies de árboles (Medlyn et al. 2001; Lodge et al. 2001). En cambio, la separación significativa de las regresiones para los dos niveles de CO₂ en temperatura ambiente + 4 °C, en el modelo de Ball et al. (1987), indica que con temperaturas más cálidas tiene lugar un desacoplamiento de las aclimataciones de los estomas y el mesófilo. Es decir, las diferencias en este modelo entre las temperaturas de crecimiento muestran que este factor ambiental provoca una aclimatación diferencial de la conductancia de los estomas y la asimilación de carbono.

Por tanto, en nuestro experimento, las plantas de trigo crecidas en CO₂ elevado tuvieron valores de g_s y A medidos a 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ significativamente reducidos, lo que indica que hay respuestas de aclimatación, tanto de g_s como de A. La

sensibilidad de los estomas a los cambios en C_i disminuyó también en CO_2 elevado. Pero el suministro de nitrógeno y las temperaturas más cálidas con un suministro alto de N redujeron la respuesta de aclimatación de g_s y A al enriquecimiento en CO_2 del aire. La relación g_s -A y la alta correlación entre las respuestas de aclimatación de ambos parámetros indican que están probablemente ligados y responden en paralelo al CO_2 elevado, en temperatura ambiente. Sin embargo, se observaron respuestas no paralelas en temperaturas superiores a la ambiente, de modo que las temperaturas más cálidas modificaron el acoplamiento del mesófilo con los estomas.

5.2. Efectos del CO_2 y la temperatura elevados en la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura

Una vez examinadas las respuestas de aclimatación de g_s y A al CO_2 alto y habiendo encontrado que esta respuesta parece darse en paralelo, excepto cuando las plantas crecen en temperatura elevada, se discutirá ahora la respuesta de la fotosíntesis (A) a la temperatura cuando las plantas han crecido en CO_2 elevado y alta temperatura. En particular, se pretendió conocer si la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura imperante en un momento dado depende del CO_2 y la temperatura a los que han crecido las plantas.

En contraste con resultados publicados previamente (Berry & Björkman 1980, Yamasaki et al. 2002, Yamori et al. 2005), en los experimentos de campo aquí discutidos la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura no se vio alterada por la temperatura a la que crecieron las plantas (modelo de regresión con curvas separadas para las dos temperaturas de crecimiento no significativo, Tabla 4.2.2). Claro que, a diferencia con los estudios citados, en nuestros experimentos la temperatura fluctuó diaria y estacionalmente, por lo que las plantas estuvieron adaptadas a un amplio rango de temperaturas. No obstante, la observación de las curvas de respuesta de la fotosíntesis a la temperatura (Figs. 4.2.1 y 4.2.2), muestra mayor elevación de la curva correspondiente a temperatura de crecimiento alta que baja en plantas crecidas en CO_2 elevado. Esto indica que, aunque no en la respuesta a la temperatura, sí hubo un efecto de la temperatura de crecimiento en la cuantía de la fotosíntesis en las plantas que crecieron en CO_2 elevado, y no en las que lo hicieron en CO_2 ambiente. Esto, concuerda con observaciones anteriores (Martínez-Carrasco et al. 2005), confirmadas en el

apartado anterior de esta Discusión, de que el crecimiento en CO₂ elevado disminuye menos la capacidad fotosintética a temperaturas más altas.

Con un CO₂ de medida de 200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ la elevación de la curva fotosíntesis-temperatura fue menor para plantas que crecieron en CO₂ elevado que para las plantas de CO₂ ambiente (Fig. 4.2.1). Por lo tanto, el crecimiento en CO₂ elevado disminuyó la capacidad fotosintética, lo que sugiere que la actividad Rubisco se reguló negativamente en lo que es una típica respuesta de aclimatación (Long et al. 2004). Además, en las plantas crecidas en CO₂ elevado el incremento en la fotosíntesis con la temperatura es mayor que en las que han crecido en CO₂ ambiente y el óptimo de temperatura para la fotosíntesis se desplaza a valores mayores (Fig.4.2.1). Esta modificación se ha encontrado cambiando a corto plazo la temperatura y manteniendo una misma concentración de CO₂ durante las medidas, por lo que se trata de una respuesta de aclimatación al CO₂ de crecimiento, diferente de las respuestas directas descritas anteriormente (Long 1991). Esta modificación, inducida por el crecimiento en CO₂ elevado, de la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura, es uno de los principales hallazgos de nuestro estudio. Estos resultados se pueden deber tanto a cambios en la conductancia estomática como a reacciones producidas en el mesófilo, pero las respuestas de V_{cmax} a la temperatura de medida y al CO₂ de crecimiento (Tabla 4.2.5; Fig. 4.2.7) sugieren que estos cambios en la fotosíntesis pueden ser explicados por factores no estomáticos.

Las diferencias en la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura entre las concentraciones de CO₂ de crecimiento fueron más evidentes a una concentración de CO₂ de medida de 200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ que a 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ el primer año de experimento y de igual modo, fueron evidentes a una concentración de CO₂ de medida cercana a la del ambiente actual en el segundo año (Fig. 4.2.3 C). Con estas concentraciones más bajas de CO₂ es la actividad Rubisco la que limita la fotosíntesis, lo que sugiere que el crecimiento en CO₂ elevado modificó la respuesta de la actividad Rubisco a la temperatura. Esto se confirmó con los resultados obtenidos en las medidas de la respuesta de V_{cmax} a la temperatura, tanto *in vitro* como *in vivo* (Tablas 4.2.1 y 4.2.5). Aunque, generalmente, con el método *in vitro* se obtienen actividades Rubisco menores que las obtenidas *in vivo*, y podría parecer que los resultados obtenidos con ambos métodos no son comparables, se sabe que la tendencia de la respuesta a tratamientos como la concentración de CO₂ del aire en las medidas *in vitro* es comparable con la observada en medidas *in vivo* (Rogers et al. 2001). Por otro lado, se puede descartar que

la conductancia del mesófilo juegue un papel en esta modificación de la respuesta de la Rubisco a la temperatura (Yamori et al. 2006), ya que ambos métodos de medida de la actividad Rubisco produjeron resultados similares, y sólo en medidas *in vivo* podría haber una influencia de dicha conductancia.

El estado de activación de la Rubisco disminuye con la temperatura alta, a la que la Rubisco activada también se desactiva y podría jugar un papel importante en este descenso (Crafts-Brandner & Salvucci 2000), pero no parece ser algo que influya decisivamente en este estudio, ya que ocurre a temperaturas más altas que las empleadas en el mismo. Nuestras medidas muestran que la energía de activación de V_{cmax} (Fig. 4.2.7) aumentó en las plantas crecidas en CO_2 elevado. Mientras que otros autores encontraron que la aclimatación a la temperatura modificó la estimulación relativa de la fotosíntesis como respuesta a incrementos a corto plazo de la concentración de CO_2 (Bunce 2000b, Ziska 2001), en nuestro estudio la aclimatación al CO_2 elevado modificó la respuesta de la catálisis de la Rubisco a la temperatura. Estos incrementos en V_{cmax} con la temperatura han sido explicados por la gran dependencia respecto a la temperatura que tienen la formación y rotura de enlaces entre el extremo carboxi-terminal de la subunidad larga de la Rubisco y la superficie de la proteína (Zhu et al. 1998) durante la apertura y cierre catalíticos del sitio activo del enzima (Newman & Gutteridge 1993, Schlitter & Wildner 2000). Otra posible explicación proviene de que a temperaturas altas la producción de inhibidores por parte de la Rubisco es mayor, pero el declive en la actividad Rubisco con el tiempo es más lento, todo lo cual sugiere un cierre más débil del sitio catalítico y una estimulación de la liberación de inhibidores de dicho sitio (Schrader et al. 2006). Lo expuesto, suscita la necesidad de nuevas investigaciones para conocer si este incremento de la respuesta a la temperatura de V_{cmax} con el crecimiento en CO_2 elevado se debe a alteraciones en la flexibilidad de las partes externas de los sitios activos de la Rubisco o está facilitado por un aumento de la separación de inhibidores de los mismos.

Asociado al aumento en la catálisis se ha observado un descenso en la afinidad de la Rubisco (incremento de K_m) por el CO_2 (Sage 2002). De hecho, parece haber una relación negativa entre la velocidad de catálisis y la especificidad por el CO_2 frente al O_2 (Zhu et al. 2004, Mitchell et al. 2005, Spreitzer et al. 2005). Si esta relación fuese estrictamente negativa, el incremento de la respuesta a la temperatura de V_{cmax} en CO_2 elevado debería conducir a un descenso en la afinidad y especificidad de la Rubisco por el CO_2 . Así, la disminución en la especificidad que se produce con el aumento de

temperatura (Long 1991) sería mayor. No obstante, en un ambiente con CO₂ alto esto podría ser mas que compensado por una V_{cmax} mayor. Mas adelante, al discutir la respuesta a la temperatura de los parámetros de la fotosíntesis (Apartado 5.3. de la Discusión) se tratará sobre una relación no negativa entre V_{cmax} y la especificidad. De forma que, el aumento de la respuesta a la temperatura de V_{cmax} podría llevar asociado no un descenso, sino un aumento de la especificidad.

Los cambios observados en la dependencia con respecto a la temperatura de la actividad Rubisco causaron modificaciones detectables en la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura a concentraciones de CO₂ ambientales y sub-ambientales. Si esta modificación de las propiedades de la Rubisco puede tener consecuencias con los futuros aumentos de CO₂ y temperatura dependerá de si en CO₂ de crecimiento elevado la fotosíntesis se encuentra limitada por la actividad Rubisco o por el transporte de electrones. Debido a los descensos en la cantidad de proteína Rubisco con el crecimiento a largo plazo bajo CO₂ elevado, nosotros hemos encontrado que, incluso aumentando el doble la concentración atmosférica de CO₂, la fotosíntesis saturada por luz esta limitada por Rubisco (Pérez et al. no publicado). Por consiguiente, los cambios en la respuesta de la Rubisco a la temperatura pueden modificar el efecto del crecimiento en concentraciones de CO₂ el doble de las actuales, compensado en parte las perdidas de proteína Rubisco e interactuando positivamente con la temperatura. Independientemente del efecto interactivo directo del CO₂ y la temperatura sobre la asimilación de carbono (Long 1991), estos cambios en las propiedades cinéticas de la Rubisco pueden incrementar el óptimo de temperatura para la fotosíntesis. Sin embargo, solo se ha encontrado un incremento modesto en el la producción de grano en los cultivos de trigo en experimentos de enriquecimiento del aire con CO₂ en temperatura ambiente, lo que arroja dudas sobre los pronósticos de que el aumento de CO₂ puede compensar las perdidas debidas al cambio climático (Long et al. 2006). Al realizar predicciones sobre el efecto fertilizante del futuro aumento de la concentración atmosférica de CO₂ sobre la producción y el crecimiento, deberá tenerse en cuenta el estímulo de la respuesta de la Rubisco a la temperatura con CO₂ de crecimiento elevado.

5.3. Respuesta de los parámetros de la fotosíntesis a la temperatura en plantas crecidas en CO₂ elevado

Una vez establecido que el CO₂ de crecimiento modifica la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura debido a un cambio en la energía de activación de la Rubisco, se discutirá si este factor ambiental induce también cambios en la dependencia térmica de otros mecanismos reguladores de la fotosíntesis, que se analizan como parámetros de un modelo bioquímico de esta última.

En la parte de nuestro estudio realizada en una cámara de crecimiento (Apartado 3.3), hay dos factores que no han sido analizados, pero que se sabe que afectan a la dependencia de la fotosíntesis respecto a la temperatura. El primero es la desactivación de la Rubisco activasa, que conduce a una disminución de la activación de la Rubisco a temperaturas altas. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, esta desactivación es más probable a temperaturas mayores que las examinadas en este estudio (Crafts-Brandner & Salvucci 2000), por lo que tendría poca influencia en este experimento.

El segundo factor es el efecto del CO₂ y la temperatura en la conductancia del mesófilo (g_m), es decir, la difusión de los gases desde los espacios de aire intercelulares hasta el estroma del cloroplasto, que puede explicar en parte la dependencia de la fotosíntesis respecto a la temperatura que se ha observado (Yamori et al. 2006). Para Singsaas et al. (2004), al realizar una corrección de la concentración de CO₂ en el cloroplasto teniendo en cuenta g_m , los valores de V_{cmax} se vieron más afectados que los de J_{max} . En estudios realizados con soja, g_m no cambia con el enriquecimiento en CO₂ al aire libre (Bernacchi et al. 2005), mientras que en el tabaco g_m depende estrechamente de la temperatura, con un óptimo entre 35-37 °C, limitando progresivamente la fotosíntesis a mayores temperaturas (Bernacchi et al. 2002). En cambio, el trigo tiene una g_m relativamente alta (Ethier & Livingston 2004), que ejercerá una limitación menor sobre la fotosíntesis. El análisis de la respuesta de los parámetros de la fotosíntesis a la temperatura en la última parte de esta Tesis (Apartado 3.3) se ha basado en la concentración de CO₂ en el cloroplasto y no en los espacios intercelulares, de forma que los cambios en la conductancia del mesófilo no afectan a los resultados obtenidos. Más aún, aunque dicha conductancia disminuye en CO₂ alto, esto se ha demostrado que tiene un efecto despreciable en las estimaciones de V_{cmax} y J_{max} (Flexas et al. 2007a).

Al contrario de nuestros experimentos precedentes y muchos estudios anteriores, que mostraron una regulación a la baja de la cantidad y actividad Rubisco en CO₂ alto (Riviere-Rolland et al. 1996; Nakano et al. 1997; Drake et al. 1997; Farage et al. 1998; Geiger et al. 1999; Moore et al. 1999; Long et al. 2004; Pérez et al. 2005), en el experimento realizado en cámara de crecimiento las medidas de fotosíntesis a la misma concentración de CO₂ indican que una exposición a largo plazo al CO₂ elevado incrementa V_{cmax} (Tabla 4.3.1). Esto se puede deber a que el crecimiento en macetas grandes (Curtis 1996) y con abundante y frecuente aporte de nutrientes (Geiger et al. 1999) puede evitar los descensos de Rubisco en CO₂ elevado. En cambio, J_{max} a 25 °C o menos tendió a disminuir con el crecimiento en CO₂ elevado (Tabla 4.3.1), como en otros casos en los que se ha observado una disminución en la capacidad de regeneración de RuBP en CO₂ elevado en dos de cinco especies examinadas (Sage et al. 1989) y en un meta-análisis de especies forestales, en el que V_{cmax} y la concentración de nitrógeno en la hoja disminuyeron en CO₂ elevado (Medlyn et al. 1999).

Los resultados de nuestro estudio muestran que el crecimiento en CO₂ elevado provocó ajustes tanto en la velocidad de la fotosíntesis como en su respuesta a la temperatura. Así, nuestras medidas con la misma concentración de CO₂ en plantas que han crecido con CO₂ diferente, revelan que el crecimiento en CO₂ elevado estimula la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura (Figs. 4.3.6 y 4.3.7), y que esta es una respuesta de aclimatación. A continuación se analiza esta respuesta de aclimatación en base a los cambios observados en los parámetros fotosintéticos del modelo de Farquhar et al. (1980).

El crecimiento en CO₂ elevado incrementó la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura a pesar de que aumentó la respiración en la luz (R_d , Tabla 4.3.2), de acuerdo con Davey et al. (2004), y en contraste con la inhibición de la respiración que otros han encontrado (para una revisión, véase Drake et al. 1999; Wang & Curtis, 2002). Esta estimulación de la respiración en CO₂ de crecimiento elevado fue notoria a pesar de las limitaciones en la precisión de su medida, impuestas por las fugas en la cámara foliar del analizador (Fig. 3.8C). Un aumento en la respiración concuerda con el mayor contenido de carbohidratos solubles encontrados en las hojas en CO₂ elevado (Moore et al. 1999, Pérez et al. 2005), y puede contrarrestar en parte el incremento en V_{cmax} , reduciendo así la estimulación de la fotosíntesis limitada por Rubisco.

Junto al cambio en R_d , el CO₂ elevado alteró también la respuesta a la temperatura de la fotosíntesis limitada por RuBP aumentando la energía de activación

de J_{\max} (Tabla 4.3.2). Se ha mostrado que la temperatura a la que se desarrollan las hojas modifica la dependencia respecto de la temperatura del transporte electrónico a la altura de las plastoquinonas y la fotólisis del agua (Yamasaki et al. 2002). Por ello es interesante investigar si el crecimiento en CO_2 elevado afecta a la dependencia respecto de la temperatura del transporte electrónico en esos mismos lugares. Niinemets et al. (1999) han sugerido que una energía de activación de J_{\max} baja se asocia con descensos en la fluidez de la membrana debidos a una mayor grado de saturación de los lípidos. Sin embargo, se ha observado que el CO_2 elevado aumenta la saturación de lípidos (Huang et al. 1999), a pesar de lo cual hemos mostrado que aumenta la energía de activación de J_{\max} . Serán necesarias nuevas investigaciones para desentrañar las razones de esta alteración en la respuesta a la temperatura de la fotosíntesis limitada por RuBP.

La respuesta de la fotosíntesis a la temperatura también aumentó con el CO_2 elevado porque se estimula (H para V_{cmax} , Tabla 4.3.2) el ya conocido aumento de V_{cmax} con la temperatura (von Caemmerer 2000) Esto confirma los datos antes discutidos (véase apartado Apartado 5.2. de esta Discusión), sobre la respuesta de la actividad *in vitro* e *in vivo* de la Rubisco a la temperatura en nuestros experimentos realizados en cámaras de gradiente de temperatura en el campo.

La especificidad de la Rubisco por el CO_2 respecto del O_2 (τ) es un parámetro de la fotosíntesis en el que es necesario detenerse ya que, entre otras cosas, se ha sugerido que guarda una relación inversa con la velocidad de catálisis de la Rubisco (Zhu et al. 2004; Mitchell et al. 2005; Spreitzer et al. 2005). Contrariamente a esto, un hallazgo remarcable de nuestra investigación es que el aumento de V_{cmax} y su respuesta a la temperatura, en plantas que han crecido con CO_2 elevado, estaba asociado a un descenso en Γ^* (el punto de compensación para el CO_2 en ausencia de respiración en la oscuridad; Tabla 4.3.1) y por ello a un aumento en τ . La relación entre τ y V_{cmax} ($\tau = V_{\text{cmax}} K_o / V_{\text{omax}} K_c$, donde V_{omax} es la velocidad máxima de oxigenación) sugiere que el incremento en τ puede ser simplemente una consecuencia del aumento de V_{cmax} con la temperatura, pero no sabemos si el crecimiento en CO_2 elevado a podido variar otros parámetros cinéticos de la Rubisco que no hemos determinado directamente en este trabajo.

Se piensa que la dependencia de la carboxilación llevada a cabo por la Rubisco respecto de la temperatura es estable entre plantas C_3 (Badger et al. 1982; Brooks & Farquhar 1985), porque las propiedades cinéticas del enzima están relativamente

conservadas (von Caemmerer 2000). Pero este trabajo muestra que, dentro de una misma especie, V_{cmax} presenta variaciones en la dependencia de la temperatura que son inducidas por la concentración de CO_2 de crecimiento. De igual forma, se ha demostrado en varias especies (Yamori et al. 2005), incluido el trigo (Yamasaki et al. 2002), que hay cambios en la dependencia de la capacidad de transporte de electrones respecto de la temperatura causados por la temperatura de crecimiento. Nuestro trabajo demuestra que la concentración de CO_2 del aire puede provocar también estos cambios. De lo expuesto se deduce que la modificación de la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura, provocada por el crecimiento en CO_2 elevado, más que a una alteración en el balance entre la regeneración de RuBP y la carboxilación de RuBP (Farquhar & von Caemmerer 1982), se debe a cambios en la dependencia respecto de la temperatura de J_{max} y V_{cmax} .

A lo largo de esta Discusión se ha mostrado que la conductancia y la fotosíntesis tienen una respuesta de aclimatación al CO_2 alto que es distinta de la respuesta directa a este factor y que ocurre en paralelo, excepto cuando las plantas crecen en temperatura elevada. También que las modificaciones en la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura cuando las plantas han crecido en CO_2 elevado se deben a que tanto la velocidad máxima de carboxilación como la capacidad máxima de transporte de electrones aumentan su respuesta al incremento de la temperatura, induciéndose además una mejora en la especificidad de la Rubisco para el CO_2 frente al O_2 . Este último efecto del crecimiento en CO_2 elevado puede, por otra parte, proporcionar claves relevantes para el considerable esfuerzo de investigación (Chen & Spreitzer 1992; Zhu et al. 1998; Schlitter & Wildner 2000) dedicado a la mejora de las propiedades de la Rubisco.

Los resultados de este estudio indican que, además de alterar la cantidad de Rubisco, el crecimiento en CO_2 elevado tiene efectos adicionales importantes en la capacidad de transporte de electrones y en la cinética de la Rubisco, que pueden mejorar la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura. Los futuros incrementos de CO_2 en el aire tendrán, por lo tanto, un efecto beneficioso en el reajuste de la fotosíntesis al calentamiento global.



CONCLUSIONES

1.- La duplicación de la concentración de CO₂ en el aire, y el aumento en 4 °C de las temperaturas, durante el crecimiento del trigo, disminuyen la sensibilidad de los estomas a la concentración de CO₂. Sin embargo, la temperatura no modifica el efecto del CO₂ de crecimiento en dicha sensibilidad.

2.- El trigo responde al aumento del CO₂ del aire durante el crecimiento disminuyendo la conductancia de los estomas y la fotosíntesis, en una típica respuesta de aclimatación. En ambientes mediterráneos la aclimatación de la conductancia estomática es de mayor magnitud que la descrita para otras latitudes.

3.- La deficiencia de nitrógeno acentúa la respuesta de aclimatación de la conductancia de los estomas y la fotosíntesis al CO₂ elevado. Sin embargo, las relaciones de la fotosíntesis y la conductancia de los estomas con la concentración foliar de nitrógeno no cambian con la concentración de CO₂ del aire durante el crecimiento.

4.- Las temperaturas altas combinadas con suministro abundante de nitrógeno reducen la respuesta de aclimatación de la fotosíntesis al enriquecimiento en CO₂ del aire. Este efecto de la temperatura en la fotosíntesis no está mediado por cambios en la apertura de los estomas, sino por las reacciones del mesófilo.

5.- A una concentración común de CO₂, los estomas limitan la fotosíntesis en mayor o la misma medida con CO₂ de crecimiento elevado que ambiente dependiendo de si la razón C_i/C_a y la conductancia cambian con el CO₂.

6.- Las aclimataciones de los estomas y el mesófilo al CO₂ elevado muestran un acoplamiento en temperaturas como las actuales. Pero a temperaturas más altas hay una aclimatación diferencial de la conductancia de los estomas y la asimilación de carbono.

7.- En plantas adaptadas a temperaturas cambiantes diaria y estacionalmente, el crecimiento en temperaturas 4 °C más altas que las actuales no modifica la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura existente en un momento dado.

8.- El aumento de la fotosíntesis con la temperatura es mayor en plantas aclimatadas a un CO_2 de crecimiento elevado, y el óptimo de temperatura para la fotosíntesis se desplaza a valores más altos que en CO_2 ambiente.

9.- El crecimiento en CO_2 elevado aumenta la respiración en la luz. Este efecto contribuye a limitar la fotosíntesis neta, especialmente la regulada por la actividad Rubisco.

10.- El crecimiento en CO_2 elevado aumenta la energía de activación de la velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco, y así su respuesta a la temperatura. Por tanto, las propiedades cinéticas del enzima no están tan conservadas como se ha indicado.

11.- El crecimiento en CO_2 elevado aumenta también la energía de activación de la capacidad máxima de transporte fotosintético de electrones, estimulando consiguientemente la respuesta de este transporte y de la fotosíntesis limitada por la regeneración de RuBP a la temperatura.

12.- El crecimiento en CO_2 elevado aumenta, aunque en pequeña medida, la especificidad de la Rubisco para el CO_2 respecto al O_2 . Este hallazgo puede ofrecer claves útiles para la mejora de las propiedades de la Rubisco

13.- El crecimiento en CO_2 elevado modifica la respuesta de la fotosíntesis a la temperatura, no tanto por alterar el balance entre la regeneración y la carboxilación de RuBP, como por cambiar la dependencia de ambos procesos respecto de la temperatura.

14.- Como consecuencia de su influencia en los procesos parciales de la fotosíntesis, Los futuros incrementos de CO_2 en el aire tendrán un efecto beneficioso en el reajuste de la asimilación de carbono al calentamiento global.

BIBLIOGRAFIA

- **Allen LH (1990)** Plant responses to rising carbon dioxide and potential interactions with air pollutants. *Journal of Environmental Quality* 19: 15-34.
- **Ainsworth EA, Rogers A, Blum H, Nösberger J & Long SP. (2003)** Variation in acclimation of photosynthesis in *Trifolium repens* after eight years of exposure to Free Air CO₂ Enrichment (FACE) *Journal of Experimental Botany*. 54: 2769-2774.
- **Andréasson LE & Vänngård T (1988)** Electron transport in photosystems I and II. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 379-411.
- **Andrews TJ (1996)** The bait in the rubisco mousetrap. *Nature Structural and Molecular Biology* 3: 3-7.
- **Andrews TJ, Hudson GS, Mate CJ, von Caemmerer S, Evans JR & Arvidson YBC (1995)** Rubisco: The consequences of altering its expression and activation in transgenic plants. *Journal Experimental Botany* 46: 1293-1300.
- **Andrews TJ & Lorimer GH (1978)** Photo-respiration - Still unavoidable. *FEBS Letters* 90: 1-9.
- **Aranjuelo I, Pérez P, Hernández L, Irigoyen JJ, Zita G, Martínez-Carrasco R & Sánchez-Díaz M (2005)** The response of nodulated alfalfa to water supply, temperature and elevated CO₂: photosynthetic downregulation. *Physiologia Plantarum* 123: 348-358.
- **Arnon DI (1991)** Photosynthetic electron transport: emergence of a concept, 1949-59. *Photosynthesis Research* 29: 117-131.
- **Assenga S, Jamieson PD, Kimball B, Pinter P & Sayred K (2004)** Simulated wheat growth affected by rising temperature, increased water deficit and elevated atmospheric CO₂. *Field Crops Research* 85: 85–102.
- **Azcón-Bieto J, Fleck I, Aranda X & Xambó A (2000)** Fotosíntesis en un ambiente cambiante. *In Fundamentos de Fisiología Vegetal*. (J. Azcón-Bieto & M. Talón Eds.) McGraw-Hill Interamericana, pp 203-216.
- **Badger MR, Bjorkman O & Armond PA (1982)** An analysis of photosynthetic response and adaptation to temperature in higher-plants - temperature-acclimation in the desert evergreen *Nerium oleander* L. *Plant, Cell and Environment* 5: 85-99.
- **Badger MR & Collantz GJ (1977)** Studies on the kinetic mechanism of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and oxygenase reactions, with particular

reference to the effect of temperature on kinetic parameters. Carnegie Inst. Washington Yearbook 76: 355-361.

- **Badger MR & Lorimer GH** (1981) Interaction of sugar phosphates with the catalytic site of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Biochemistry* 20: 2219-2225.
- **Ball JT, Woodrow IE & Berry JA** (1987) A model predicting stomatal conductance and its contribution to the control of photosynthesis under different environmental conditions. *In Progress in Photosynthesis Research* (J. Biggins Eds.) Martinus-Nijhoff Publishers, pp. 221-224.
- **Batts GR, Ellis RH, Morison JIL, Nkemka PN, Gregory PJ & Hadley P** (1998) Yield and partitioning in crops of contrasting cultivars of winter wheat in response to CO₂ and temperature in field studies using temperature gradient tunnels. *Journal of Agriculture Science* 130: 17–27.
- **Bazzaz FA** (1990) The response of natural ecosystems to the rising global CO₂ level. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 167-196.
- **Benson AA** (2002) Following the path of carbon in photosynthesis: a personal story. *Photosynthesis Research* 73: 29-49.
- **Bernacchi CJ, Morgan PB, Ort DR & Long SP** (2005) The growth of soybean under free air [CO₂] enrichment (FACE) stimulates photosynthesis while decreasing in vivo Rubisco capacity. *Planta* 220: 434–446.
- **Bernacchi CJ, Pimentel C & Long SP** (2003) In vivo temperature response functions of parameters required to model RuBP-limited photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 26: 1419-1430.
- **Bernacchi CJ, Portis AR, Nakano H, von Caemmerer S & Long SP** (2002) Temperature response of mesophyll conductance. Implications for the determination of rubisco enzyme kinetics and for limitations to photosynthesis in vivo. *Plant Physiology* 130: 1992-1998.
- **Bernacchi CJ, Singaas EL, Pimentel C, Portis AR JR & Long SP** (2001) Improved temperature response functions for models of Rubisco-limited photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 24: 253-259.
- **Berry J & Björkman O** (1980) Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 31: 491-543.
- **Bolas BD & Henderson FY** (1928) The effect of increased atmospheric carbon dioxide on the growth of plants. *Annals of Botany* 42: 509-523.

-
- **Bowes G** (1991) Growth at elevated CO₂: Photosynthetic responses mediated through Rubisco. *Plant, Cell and Environment* 14: 795-806.
 - **Bowes G, Ogren WL & Hageman RH** (1971) Phosphoglycolate production catalysed by ribulose diphosphate carboxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 45: 71116-71122.
 - **Brooks A & Farquhar GD.** (1985) Effect of temperature on the CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase and the rate of respiration in the light - estimates from gas-exchange measurements on spinach. *Planta* 165: 397-406.
 - **Bunce JA** (1998) The temperature dependence of the stimulation of photosynthesis by elevated carbon dioxide in wheat and barley. *Journal of Experimental Botany* 49: 1555-1561.
 - **Bunce JA** (2000a) Acclimation of photosynthesis to temperature in eight cool and warm climate herbaceous C₃ species: Temperature dependence of parameters of a biochemical photosynthesis model. *Photosynthesis Research* 63: 59-67.
 - **Bunce JA** (2000b) Acclimation to temperature of the response of photosynthesis to increased carbon dioxide concentration in *Taraxacum officinale*. *Photosynthesis Research* 64: 89-94.
 - **Bunce JA** (2001) Direct and acclimatory responses of stomatal conductance to elevated carbon dioxide in four herbaceous crop species in the field. *Global Change Biology* 7: 323–331.
 - **Burkart S, Manderscheid R & Weigel HJ** (2000) Interacting effects of photosynthetic photon flux density and temperature on canopy CO₂ exchange rate of spring wheat under different CO₂-concentrations. *Journal of Plant Physiology* 157: 31–39.
 - **Collatz GJ, Ball JT, Grivet C & Berry JA** (1991) Physiological and environmental regulation of stomatal conductance, photosynthesis and transpiration: a model that includes a laminar boundary layer. *Agricultural and Forest Meteorology* 54: 107-136.
 - **Crafts-Brandner SJ & Salvucci ME** (2000) Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO₂. *Proceeding of the National Academy Science of the United States of America* 97: 13430-13435.

- **Cure JD** (1985) Carbon dioxide doubling responses: a crop survey. *In* Direct Effects of Increasing Carbon Dioxide on Vegetation (B.R. Strain & J.D. Cure Eds.) Department of Energy, Washington, D.C. pp 100-116.
- **Cure JD & Acock B** (1986) Crop responses to carbon dioxide doubling: a literature survey. *Agricultural and Forest Meteorology* 38: 127-145.
- **Curtis PS** (1996) A meta-analysis of leaf gas exchange and nitrogen in trees grown under elevated carbon dioxide. *Plant, Cell and Environment* 19: 127–137.
- **Curtis PS & Wang X** (1998) A meta-analysis of elevated CO₂ effects on woody plant mass, form, and physiology. *Oecologia* 113: 299-313.
- **Chen Z & Spreitzer RJ** (1992) How various factors influence the CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase. *Photosynthesis Research* 31: 157-164.
- **Davey PA, Hunt S, Hymus GJ, DeLucia EH, Drake BG, Karnosky DF & Long SP.** (2004) Respiratory oxygen uptake is not decreased by an instantaneous elevation of [CO₂], but is increased with long-term growth in the field at elevated [CO₂]. *Plant Physiology* 134: 1-8.
- **Delgado E, Mitchell RAC, Parry MAJ, Driscoll SP, Mitchell VJ & Lawlor DW** (1994) Interacting effects of CO₂ concentration, temperature and nitrogen supply on the photosynthesis and composition of winter-wheat leaves. *Plant Cell and Environment* 17: 1205–1213.
- **Dodd IC, Tan LP & He J** (2003) Do increases in xylem sap pH and/or ABA concentration mediate stomatal closure following nitrate deprivation? *Journal of Experimental Botany* 54, 1281-1288.
- **Drake BG** (1992) The impact of rising CO₂ on ecosystem production. *Water Air and Soil Pollution* 64: 25-44.
- **Drake BG, Azcon-Bieto J, Berry J, Bunce J, Dijkstra, Farrar J, Gifford RM, Gonzalez-Meler MA, Koch G, Lambers H, Siedow J & Wullschleger S** (1999) Does elevated atmospheric CO₂ concentration inhibit mitochondrial respiration in green plants? *Plant, Cell and Environment* 22: 649–657.
- **Drake BG, Gonzalez-Meler MA & Long SP** (1997) More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO₂? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 609-639.

- **Drake BG & Leadley PW** (1991) Canopy photosynthesis of crops and native plant communities exposed to long-term elevated CO₂. *Plant Cell and Environment* 14: 853-860.
- **Drake BG & Long SP** (1991) Photosynthetic productivity and rising atmospheric CO₂ concentrations. *In* Crop Photosynthesis: Spatial and Temporal Determinants (N.R. Baker & H. Thomas Eds.) Elsevier. Amsterdam.
- **Eamus D & Jarvis PG** (1989) The direct effects of increases in the global atmospheric concentration of CO₂ on natural and temperate trees and forests. *In* Advances in Ecological Research 19. (M. Begon, A.H. Fitter, E.D. Ford, A. MacFadyen Eds.) Academic Press pp: 1-49.
- **Edwards GE & Walker DA** (1983) C₃, C₄, mechanisms, and cellular and environmental regulation of photosynthesis. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford. 542 págs.
- **Ethier GJ & Livingston NJ** (2004) On the need to incorporate sensitivity to CO₂ transfer conductance into Farquhar-von Caemmerer-Berry leaf photosynthesis model. *Plant Cell and Environment* 27: 137-153.
- **Farage P, McKee I & Long SP** (1998) Does a low nitrogen supply necessarily lead to acclimation of photosynthesis to elevated CO₂? *Plant Physiology* 118: 573-580.
- **Farquhar GD & Sharkey TD** (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 33: 317-345.
- **Farquhar GD & von Caemmerer S** (1982) Modelling of photosynthetic response to environmental conditions. *In* Physiological Plant Ecology II. (O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond and H. Ziegler Eds.) Springer-Verlag Berlin pp 549-587.
- **Farquhar GD, von Caemmerer S & Berry JA** (1980) A Biochemical-Model of Photosynthetic CO₂ Assimilation in Leaves of C-3 Species. *Planta* 149: 78-90.
- **Feller U, Crafts-Brandner SJ & Salvucci ME** (1998) Moderately high temperatures inhibit ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) activase-mediated activation of Rubisco. *Plant Physiology* 116: 539-546.
- **Flexas J, Diaz-Espejo A, Galmes J, Kaldenhoff R, Medrano H & Ribas-Carbó M** (2007a) Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. *Plant Cell and Environment* 30: 1284-1298.

- **Flexas J, Diaz-Espejo A, Berry JA, Cifre J, Galmes J, Kaldenhoff R, Medrano H & Ribas-Carbo** (2007b) Analysis of leakage in IRGA's leaf chambers of open gas exchange systems: quantification and its effects in photosynthesis parameterization. *Journal of Experimental Botany* 58: 1533-1543.
- **Foyer CH** (1987) The basis for source-sink interaction in leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 25: 649- 657.
- **Geiger M, Haake V, Ludewig F, Sonnewald U & Stitt M** (1999) The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant, Cell and Environment* 22: 1177-1199.
- **Gifford RM** (1992) Implications of the Globally increasing atmospheric CO₂ concentration and temperature for the Australian Terrestrial Carbon Budget - Integration Using A Simple-Model. *Australian Journal of Botany* 40: 527-543.
- **Goldschmidt EE & Huber SC** (1992) Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose and hexose sugars. *Plant Physiology* 99: 1443- 1448.
- **Haldimann P & Feller U** (2004) Inhibition of photosynthesis by high temperature in oak (*Quercus pubescens* L.) leaves grown under natural conditions closely correlates with a reversible heat-dependent reduction of the activation state of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase *Plant Cell and Environment* 27 1169-1183.
- **Harley PC & Sharkey TD** (1991) An improved model of C₃ photosynthesis at high CO₂: reversed O₂ sensitivity explained by lack of glycerate reentry into the chloroplast. *Photosynthesis Research* 27: 169-178.
- **Harmens H, Stirling CM, Marshall C & Farra J.** (2000) Does down-regulation of photosynthetic capacity by elevated CO₂ depend on N supply in *Dactylis glomerata*? *Physiologia Plantarum* 108: 43-50.
- **Hartman FC & Harpel MR** (1994) Structure, function, regulation, and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Annual Review of Biochemistry* 63: 197-234.
- **Hartman FC, Stringer CD, Milanez S & Lee EH** (1986) The active-site of Rubisco. *Philosophical Transactions of The Royal Society of London Series B-Biological Sciences.* 313: 379-395.

- **Herold A** (1980) Regulation of photosynthesis by sink activity - the missing link. *New Phytologist* 86: 131-144.
- **Hewitt EJ** (1966) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical Communications n° 22, 2° ed. Commonwealth Agricultural Bureau, 430-472.
- **Hikosaka K, Murakami A & Hirose T** (1999) Balancing carboxylation and regeneration of ribulose-1,5-bisphosphate in leaf photosynthesis in temperature acclimation of an evergreen tree, *Quercus myrsinaefolia*. *Plant Cell and Environment* 22: 841–849.
- **Hikosaka K, Ishikawa K, Borjigidai A, Muller O & Onoda Y** (2006) Temperature acclimation of photosynthesis: mechanisms involved in the changes in temperature dependence of photosynthetic rate. *Journal of Experimental Botany* 57: 291–302.
- **Hill R & Bendall F** (1960) Function of the two cytochrome components in chloroplasts; A working hypothesis. *Nature* 186: 136-137.
- **Holmén K** (1992) The global carbon cycle. En *Global biogeochemical Cycles*. Eds: SS Butcher, RJ Charlson, GH Orians, GV Wolfe. Academic Press, Cambridge.
- **Houghton JT, Jenkins GJ & Ephraums JJ** (1990) Climate change. *In* The IPCC Scientific Assessment. Cambridge University Press, Cambridge.
- <http://cdiac.esd.ornl.gov/trends/co2/lawdome.html>
- <http://cdiac.esd.ornl.gov/trends/co2/vostok.html>
- <http://www.scientific.force9.ac.uk>.
- **Huang Y, Eglinton G, Ineson P, Bol R & Harkness DD.** (1999) The effects of nitrogen fertilization and elevated CO₂ on the lipid biosynthesis and carbon isotopic discrimination in birch seedlings (*Betula pendula*). *Plant and Soil* 216: 35-45.
- **Huber SC** (1989) Biochemical mechanism for regulation of sucrose accumulation in leaves during photosynthesis. *Plant Physiology* 91: 656-662.
- **Humphries SW & Long SP** (1995) WIMOVAC: a software package for modelling the dynamics of plant leaf and canopy photosynthesis. *Computer Applications in the Biosciences* 11: 361–371.
- **IPCC** (2001) The Scientific Basis. Third Assessment Report of Working Group I. (J.T. Houghton, D. Yihui y col. Eds.) Cambridge University Press, Cambridge.

- **Idso SB** (1989) Carbon Dioxide and Global Change: Earth in transitions. IBR Press, Tempe, Arizona. p: 292.
- **Idso KE & Idso SB** (1994) Plant response to atmospheric CO₂ enrichment in the face of environmental constraints: a review of the past 10 years research. *Agricultural and Forest Meteorology* 69: 153-203.
- **Israel DW, Rufty TW Jr & Cure JD** (1990) Nitrogen and phosphorus nutritional interactions in a CO₂ enriched environment. *Journal of Plant Nutrition* 13: 1419-1433.
- **Jahnke S & Krewitt M** (2002) Atmospheric CO₂ concentration may directly affect leaf respiration measurement in tobacco, but not respiration itself. *Plant Cell and Environment* 25: 641–651.
- **Jordan DB & Ogren WL** (1981) Species variation in the specificity of ribulose carboxylase/oxygenase. *Nature* 291: 513-515.
- **Jordan DB & Ogren WL** (1984) The CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta* 161: 308-313.
- **Kane HJ, Wilkin JM, Portis AR, Andrews TJ** (1998) Potent inhibition of ribulose-bisphosphate carboxylase by an oxidized impurity in ribulose-1,5-bisphosphate. *Plant Physiology* 117: 1059–1069.
- **Keeling CD** (1986) Atmospheric CO₂ concentrations-Mauna Loa Observatory, Hawaii 1958-1986. NDP-001/R1. Carbon dioxide information analysis center, Oakridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee p 128.
- **Keys AJ** (2006) The re-assimilation of ammonia produced by photorespiration and the nitrogen economy of C-3 higher plants. *Photosynthesis Research* 87: 165-175.
- **Kimball BA** (1983a) Carbon dioxide and agricultural yield: an assemblage and analysis of 430 prior observations. *Agronomy Journal* 75: 779-788.
- **Kimball BA** (1983b) Carbon dioxide and agricultural yield: an assemblage and analysis of 770 prior observations. WCL. Rep. 14, US Water conservation laboratory, Phoenix, AZ p:71.
- **Kirschbaum MUF & Farquar GD** (1984) Temperature dependence of whole leaf photosynthesis in *Eucalyptus pauciflora* Sieb.ex.Spreng. *Australian Journal of Plant Physiology* 11: 519-538.

- **Kozaki A & Takeba G** (1996) Photorespiration protects C₃ plants from photooxidation. *Nature* 384: 557-560.
- **Krapp A, Hofmann B, Schäfer C & Stitt M** (1993) Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink' regulation of photosynthesis? *Plant Journal* 3: 817-828.
- **Laisk A** (1977) Kinetics of photosynthesis and photorespiration in C₃ plants. Nauka, Moscow (in Russian).
- **Larcher W** (2003) *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag, Berlin. pp 57-166.
- **Laurila H** (2001) Simulation of spring wheat responses to elevated CO₂ and temperature by using CERES-wheat crop model. *Agricultural Food Science Finland* 10: 175–196.
- **Law RD & Crafts-Brandner SJ** (1999) Inhibition and acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiology* 120: 173-181.
- **Lawlor DW** (1987) *Photosynthesis: metabolism, control and physiology*. Longman Scientific & Technical, Harlow. 262 págs.
- **Lawlor DW** (1993) *Photosynthesis: molecular, physiological and environmental processes*, 2nd de. Burnt Mill, Harlow: Longman Scientific and Technical. Essex, CM20 JE, England.
- **Lawlor DW & Mitchell RAC** (1991) The effects of increasing CO₂ on crop photosynthesis and productivity: a review of field studies. *Plant, Cell and Environment* 14: 807-818.
- **Leegood RC** (1990) Enzymes of the Calvin cycle. *In Methods in plant biochemistry*. Vol.3. (P.J. Lea, Eds.) Academic press. London. pp 15-37.
- **Leegood RC, Lea PJ, Adcock MD & Häusler RE** (1995) The regulation and control of photorespiration. *Journal of Experimental Botany* 46: 1397-1414.
- **Lilley RMcC & Walker DA** (1974) An improved spectrophotometric assay for ribulosebiphosphate carboxylase. *Biochimica et Biophysica Acta* 358: 226–229.
- **Lodge RJ, Dijkstra P, Drake BG & Morison JIL** (2001) Stomatal acclimation to increased CO₂ concentration in a Florida scrub oak species *Quercus myrtifolia* Willd. *Plant, Cell and Environment* 24: 77- 88.

- **Long SP** (1991) Modification of the response of photosynthetic productivity to rising temperature by atmospheric CO₂ concentrations: Has its importance been underestimated? *Plant, Cell and Environment* 14: 729-739.
- **Long SP, Ainsworth EA, Rogers A & Ort DR** (2004) Rising atmospheric carbon dioxide: Plants FACE the future. *Annual Review of Plant Biology* 55: 591-628.
- **Long SP & Bernacchi CJ** (2003) Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to 110 photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany* 5: 2393–2401.
- **Lorimer GH** (1981) Ribulose-1,5-bisphosphate: the primary events in photosynthesis and photorespiration. *Annual Review of Plant Physiology* 32: 349-383.
- **Lorimer GH, Badger MR & Andrews TJ** (1976) The activation of ribulose-1,-bisphosphate carboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. Equilibria, kinetics, a suggested mechanism, and physiological implications. *Biochemistry* 15: 529-536.
- **Lorimer GH, Gutteridge S & Madden M** (1987) Partial reactions of ribulose bisphosphate carboxylase: Their utility in the study of mutant enzymes. *In Plant Molecular Biology* (D. von Wettstein, N.H. Chua Eds.) Plenum Press, New York. pp 21-31.
- **Malkin R & Niyogi K** (2000) Photosynthesis. *In Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds.) American Society of Plant Physiologists. pp 568-628.
- **Makino A, Mae T & Ohira K.** (1988) Differences between wheat and rice in the enzymatic properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase /oxygenase and the relationship to photosynthetic gas exchange. *Planta* 174: 30-38.
- **Martínez-Carrasco R, Pérez P & Morcuende R** (2005) Interactive effects of elevated CO₂, temperature and nitrogen on photosynthesis of wheat grown under temperature gradient tunnels. *Environmental and Experimental Botany* 54: 49–59.
- **Mate CJ, von Caemmerer S, Evans JR, Hudson GS & Andrews TJ.** (1996) The relationship between CO₂ assimilation rate, Rubisco carbamylation and Rubisco activase content in activase-deficient transgenic tobacco suggests a simple model of activase action. *Planta* 198: 604-613.

- **Medrano H & Flexas J** (2000) Fijación del dióxido de carbono y biosíntesis de fotoasimilados. *In* Fundamentos de Fisiología Vegetal. (J. Azcón-Bieto & M. Talón Eds.) McGraw-Hill Interamericana. pp 173-185.
- **Medlyn BE, Barton CVM, Broadmeadow MSJ, Ceulmans R, De Angelis P, Forstreuter M, Freeman M, Jackson SB, Kellomäki S, Laitat E, Rey A, Roberntz P, Sigurdsson BD, Strassmeyer J, Wang K, Curtis PS, Jarvis PG** (2001) Stomatal conductance of forest species after long-term exposure to elevated CO₂ concentration: a synthesis. *New Phytologist* 149: 247- 264.
- **Medlyn BE, Dreyer E, Ellsworth D, Forstreuter M, Harley PC, Kirschbaum MUF, Le Roux X, Montpied P, Strassmeyer J, Walcroft A, Wang K & Loustau D** (2002) Temperature response of parameters of a biochemically based model of photosynthesis. II. A review of experimental data. *Plant Cell and Environment* 25: 1167–1179.
- **Melillo JM, Callaghan TV, Woodward FI, Salati E & Sinha SK.** (1990) Effects on ecosystems. *In* Climate Change: The IPCC Scientific Assessment (J.T. Houghton, G.J. Jenkins & J.J. Ephraums Eds.) Cambridge University Press, Cambridge. pp 283-310.
- **Mitchell RAC, Keys AJ, Madgwick PJ, Parry MAJ & Lawlor DW.** (2005) Adaptation of photosynthesis in marama bean *Tylosema esculentum* (Burchell A. Schreiber) to a high temperature, high radiation, drought-prone environment. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 969–976.
- **Mitchell RAC, Lawlor DW, Mitchell VJ, Gibbard CL, White EM & Porter JR** (1995) Effects of elevated CO₂ concentration and increased temperature on winter-wheat - test of arcwheat1 simulation-model. *Plant Cell and Environment* 18: 736-748.
- **Moore BD, Cheng S-H, Sims D & Seemann JR** (1999) The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant, Cell and Environment* 22: 567-582.
- **Morison JIL** (1998) Stomatal response to increased CO₂ concentration. *Journal of Experimental Botany* 49: 443- 452.
- **Morison JIL & Lawlor DW** (1999) Interactions between increasing CO₂ concentration and temperature on plant growth. *Plant, Cell and Environment* 22: 656-662.

- **Mortensen LM** (1987) CO₂ enrichment in greenhouses. Crop responses. *Science and Horticulture* 33: 1-25.
- **Mott KA** (1988) Do stomata respond to CO₂ concentrations other than intercellular. *Plant Physiology* 86: 200–203.
- **Nakano H, Makino A & Mae T** (1997) The effect of elevated partial pressures of CO₂ on the relationship between photosynthetic capacity and N content in rice leaves. *Plant Physiology* 115: 191-198.
- **Newman J & Gutteridge S.** (1993) The X-ray structure of *Synechococcus* Ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase-activated quaternary complex at 2.2-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry* 268: 25876-25886.
- **Niinemets Ü, Oja V & Kull O.** (1999) Shape of leaf photosynthetic electron transport versus temperature response curve is not constant along canopy light gradients in temperate deciduous trees. *Plant, Cell and Environment* 22: 1497–1513.
- **Patterson DT & Flint EP** (1990) Implications of increasing carbon dioxide and climate change for plant communities and competition in natural and managed ecosystems. *In* Impact of Carbon Dioxide, Trace Gases, and Climate Change on Global Agriculture, ASA Publ. No.53 (B.A. Kimball, N.J. Rosenberg & L.H. Allen Eds.) American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. pp 83-110.
- **Pérez P, Morcuende R, Martín del Molino I & Martínez-Carrasco R.** (2005) Diurnal changes of Rubisco in response to elevated CO₂, temperature and nitrogen in wheat grown under temperature gradient tunnels. *Environmental and Experimental Botany* 53: 13-27.
- **Peterson AG, Ball JT, Luo Y, Field Cb, Curtis PS, Griffin KL, Gunderson CA, Norby RJ, Tissue DT, Forstreuter M, Rey A, Vogel CS & CMEAL participants** (1999) Quantifying the response of photosynthesis to changes in leaf nitrogen content and leaf mass per area in plants grown under atmospheric CO₂ enrichment. *Plant, Cell and Environment* 22: 1109-1119.
- **Pons TL & Welschen RAM** (2002) Overestimation of respiration rates in commercially available clamp-on leaf chambers. Complications with measurement of net photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 25: 1367–1372.
- **Poorter H** (1993) Interspecific variation in the growth response of plants to an elevated ambient CO₂ concentration. *Vegetatio* 104/105: 77-97.

- **Poorter H & Pérez-Soba M** (2001) The growth response of plants to elevated CO₂ under non-optimal environmental conditions. *Oecologia* 129: 1-20.
- **Portis A R Jr** (1995) The regulation of Rubisco by Rubisco activase. *Journal of Experimental Botany* 46: 1285-1291.
- **Portis, AR Jr** (2003) Rubisco activase-Rubisco's Catalytic chaperone. *Photosynthesis Research* 75: 11-27.
- **Rawson HM, Gifford RM & Condon BN** (1995) Portable temperature gradient chambers for research on short stature vegetation. *Plant Cell and Environment* 18: 1048-1054.
- **Riviere-Rolland H, Contard P & Betsche T** (1996) Adaptation of pea to elevated atmospheric CO₂: Rubisco, phosphoenolpyruvate carboxylase and chloroplast phosphate translocator at different levels of nitrogen and phosphorus nutrition. *Plant, Cell and Environment* 19: 109-117.
- **Robinson SP, & Portis AR Jr** (1989) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase activase protein prevents the invitro decline in activity of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase. *Plant Physiology* 90: 968-971.
- **Rodeghiero M, Niinemets Ü & Cescatti A** (2007) Major diffusion leaks of clamp-on leaf cuvettes still unaccounted: how erroneous are the estimates of Farquhar *et al.* model parameters? *Plant, Cell and Environment* 30: 1006–1022.
- **Rogers HH & Dahlman RC** (1993) Crop response to CO₂ enrichment. *Vegetatio* 104-105: 117-131.
- **Rogers A, Ellsworth DS & Humphries SW** (2001) Possible explanation of the disparity between the *in vitro* and *in vivo* measurements of rubisco activity: a study in loblolly pine grown in elevated pCO₂. *Journal of Experimental Botany* 52: 1555-1561.
- **Rogers A, Fischer B, Bryant J, Frehner M, Blum H, Raines C & Long SP** (1998) Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ under low-nitrogen nutrition is affected by the capacity for assimilate utilization. Perennial ryegrass under free air CO₂ enrichment. *Plant Physiology* 118: 683-698.
- **Rogers A & Humphries SW** (2000) A mechanistic evaluation of photosynthetic acclimation at elevated CO₂. *Global Change Biology* 6: 1005–1011.

- **Rosenberg NJ** (1981) The increasing CO₂ concentration in the atmosphere and its implication on agricultural productivity. I. Effect on photosynthesis, transpiration and water use efficiency. *Climate Change* 3: 265-279.
- **Sage RF** (2002) Variation in the k_{cat} of Rubisco in C₃ and C₄ plants and some implications for photosynthetic performance at high and low temperature. *Journal of Experimental Botany* 53: 609–620.
- **Sage RF, Sharkey TD & Seemann JR.** (1989) Acclimation of photosynthesis to elevated CO₂ in 5 C-3 species. *Plant Physiology* 89: 590-596.
- **Salvucci ME & Ogren WL** (1996) The mechanism of rubisco activase: Insights from studies of the properties and structure of the enzyme. *Photosynthesis Research* 47: 1-11.
- **Šantrůček J & Sage RF.** (1996) Acclimation of stomatal conductance to a CO₂-enriched atmosphere and elevated temperature in *Chenopodium album*. *Australian Journal of Plant Physiology* 23: 467-478.
- **Sánchez-Díaz M, Irigoyen JJ, Gómez-Casanovas N, Pardo A & Azcón-Bieto J** (2004) El cambio climático global. Efecto previsible del CO₂ sobre los vegetales. *In* La Ecofisiología Vegetal. Una Ciencia de Síntesis (M. Reigosa, N. Pedrol, A. Sánchez-Moreiras Eds.). Universidad de Vigo, Vigo, Spain, pp 1111-1140.
- **Scheibe R** (1987) NADP⁺-malate deshydrogenase in C₃ plants: regulation and role of a light-activated enzyme. *Physiologia Plantarum* 71: 393-400.
- **Schlitter J & Wildner GF.** (2000) The kinetics of conformation change as determinant of Rubisco's specificity. *Photosynthesis Research* 65: 7-13.
- **Schneider G, Lindqvist Y, Branden CI** (1992) Rubisco - structure and mechanism. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 21: 119-143.
- **Schrader SM, Kane HJ, Sharkey TD & von Caemmerer S.** (2006) High temperature enhances inhibitor production but reduces fallover in tobacco Rubisco. *Functional Plant Biology* 33: 921–929.
- **Seeman JR, Berry JA, Freas SM & Krump MA** (1985) Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in vivo by light modulated inhibitor of catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82, 8024-8028.
- **Sharkey TD** (1985) O₂-insensitive photosynthesis in C₃ plants. Its occurrence and a possible explanation. *Plant Physiology* 78: 71-75.

- **Sharkey TD** (2005) Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. *Plant Cell and Environment* 28: 269–277.
- **Sharkey TD, Bernacchi CJ, Farquhar GD & Singaas EL** (2007) Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C₃ leaves. *Plant, Cell and Environment*. 30: 1035-1040.
- **Sharkey TD, Savich LV & Butz ND** (1991) Photometric method for routine determination of *K_{cat}* and carbamylation of rubisco. *Photosynthesis Research*. 28: 41-48.
- **Sheen J** (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* 2: 1027-1038.
- **Sicher RC & Bunce JA** (1997) Relationship of photosynthetic acclimation to changes of Rubisco activity in field-grown winter wheat and barley during growth in elevated carbon dioxide. *Photosynthesis Research* 52: 27-38.
- **Singaas EL, Ort DR & Delucia EH.** (2004) Elevated CO₂ effects on mesophyll conductance and its consequences for interpreting photosynthetic physiology. *Plant, Cell and Environment* 27, 41–50.
- **Spreitzer RJ, Peddi SR & Satagopan S.** (2005) Phylogenetic engineering at an interface between large and small subunits imparts land-plant kinetic properties to algal Rubisco. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 17225-17230.
- **Spreitzer RJ & Salvucci ME** (2002) Rubisco: Structure, regulatory interactions and possibilities for a better enzyme. *Annual Review of Plant Biology* 53: 449-475.
- **Stitt M** (1991) Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment* 14: 741-762.
- **Stitt M & Krapp A** (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell and Environment* 22: 583-621.
- **Tuba Z, Szente K & Koch J** (1994) Response of photosynthesis, stomatal conductance, water use efficiency and production to long-term elevated CO₂ in winter wheat *Journal of Plant Physiology*. 144: 661-668.
- **Van Helmont** (1648) *Ortus Medicinae*, Amsterdam p. 108.

- **van Oijen M, Schapendonk AHCM, Jansen MJH, Pot CS, van Kleef J, Goudriaan J** (1998) Effects of elevated CO₂ on development and morphology of spring wheat grown in cooled and non-cooled open-top chambers. *Australian Journal of Plant Physiology* 25: 617–626.
- **von Caemmerer S** (2000) Biochemical model of leaf photosynthesis. CSIRO Publishing, Canberra, Australia.
- **von Caemmerer S & Evans JR** (1991) Determination of the average partial pressure of CO₂ in chloroplasts from leaves of several C₃ plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 18: 287-305.
- **von Caemmerer S & Quick WP** (2000) Rubisco: Physiology in vivo. *In* Photosynthesis: Physiology and Metabolism. (R.C. Leegood, T.D. Sharkey and S. Von Caemmerer Eds.). Kluwer Academic Publishers pp. 85-113.
- **Vu JCV, Allen Jr LH, Boote KJ & Bowes G** (1997) Effects of elevated CO₂ and temperature on photosynthesis and rubisco in rice and soybean. *Plant, Cell and Environment* 20: 68-76.
- **Vu JCV, Allen LH & Bowes G** (1984) Dark/light modulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in plants from different photosynthetic categories. *Plant Physiology* 76: 843-845.
- **Walcroft AS, Whitehead D, Silvester WB & Kelliher FM** (1997) The response of photosynthetic model parameters to temperature and nitrogen concentration in *Pinus radiata* D.Don. *Plant Cell and Environment* 20: 1338-1348.
- **Wang XZ & Curtis P.** (2002) A meta-analytical test of elevated CO₂ effects on plant respiration. *Plant Ecology* 161: 251–261.
- **Wanz ZY & Portis AR** (1992) Dissociation of ribulose-1,5-bisphosphate bound to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase and its enhancement by ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase activase-mediated hydrolysis of ATP. *Plant Physiology* 99: 1348-1353.
- **Watson RT, Rodhe H, Oescheger H & Siegenthaler U** (1990) Climate. *In* The IPCC scientific assessment. (J.T. Houghton, G.J. Jenkins, J.J. Ephraums Eds.) Cambridge University, Cambridge. pp: 1-40.
- **Weis E & Berry JA** (1988) Plants and high temperature stress. *Symposia of the Society for Experimental Biology* (Long SP. y Woodward FI. eds.). The Company of Biologist, Cambridge, UK. pp: 3329-346.

-
- **Yamasaki T, Yamakawa T, Yamane Y, Koike H, Satoh K & Katoh S** (2002) Temperature acclimation of photosynthesis and related changes in photosystem II electron transport in winter wheat. *Plant Physiology* 128: 1087-1097.
 - **Yamori W, Noguchi K & Terashima I** (2005) Temperature acclimation of photosynthesis in spinach leaves: analyses of photosynthetic components and temperature dependencies of photosynthetic partial reactions. *Plant Cell and Environment* 28: 536–547.
 - **Yamori W, Noguchi K, Hanba YT & Terashima I** (2006) Effects of internal conductance on the temperature dependence of the photosynthetic rate in spinach leaves from contrasting growth temperatures. *Plant and Cell Physiology* 47: 1069–1080.
 - **Zanetti S, Hartwig UA, Lushcer A, Hebeisen T, Frehner M, Fischer BU, Hendrey GR, Blum H & Nosberger J** (1996) Stimulation of symbiotic N₂ fixation in *Trifolium repens* L. under elevated atmospheric pCO₂ in a grassland ecosystem. *Plant Physiology* 112: 575-583.
 - **Zhu G, Jensen RG, Bohnert HJ, Wildner GF & Schlitter J** (1998) Dependence of catalysis and CO₂/O₂ specificity of Rubisco on the carboxy-terminus of the large subunit at different temperatures. *Photosynthesis Research* 57: 71-79.
 - **Zhu X-G, Portis AR & Long SP** (2004) Would transformation of C₃ crop plants with foreign Rubisco increase productivity? A computational analysis extrapolating from kinetic properties to canopy photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 27: 155–165.
 - **Ziska LH** (2001) Growth temperature can alter the temperature dependent stimulation of photosynthesis by elevated carbon dioxide in *Albutilon theophrasti*. *Physiologia Plantarum* 111: 322-328.

