

Facultad de Biología

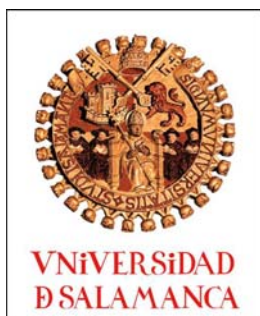
Departamento de Fisiología Vegetal

ACLIMATACIÓN DE LA FOTOSÍNTESIS EN EL DOSEL VEGETAL DEL TRIGO AL AUMENTO DEL CO₂ ATMOSFÉRICO. FUNCIÓN DEL NITRÓGENO Y LAS CITOQUININAS EN CULTIVOS EN CÁMARAS DE CAMPO CON CLIMA MEDITERRÁNEO.



Diego Gutiérrez del Pozo

Tesis Doctoral



Facultad de Biología

Departamento de Fisiología Vegetal

ACLIMATACIÓN DE LA FOTOSÍNTESIS EN EL DOSEL VEGETAL DEL TRIGO AL AUMENTO DEL CO₂ ATMOSFÉRICO. FUNCIÓN DEL NITRÓGENO Y LAS CITOQUININAS EN CULTIVOS EN CÁMARAS DE CAMPO CON CLIMA MEDITERRÁNEO.

Memoria para optar al grado de Doctor en Biología presentada por el

Licenciado **D. Diego Gutiérrez del Pozo**

2010

Directores:



Dr. Rafael Martínez-Carrasco Tabuenca y Dra. M^a Pilar Pérez Pérez, Profesor de Investigación y Científico Titular, respectivamente, del *Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca* (IRNASA-CSIC).

Tutora:

Dra. Nieves Villalobos Juárez, Profesora Titular del *Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología* en la Universidad de Salamanca.



Los Dres. **Rafael Martínez-Carrasco Tabuenca** y **M^a Pilar Pérez Pérez**, Profesor de Investigación y Científica Titular, respectivamente, del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC).

AUTORIZAN:

La defensa del trabajo realizado bajo su dirección en el IRNASA-CSIC por D. **Diego Gutiérrez del Pozo** titulado: “ ACLIMATACIÓN DE LA FOTOSÍNTESIS EN EL DOSEL VEGETAL DEL TRIGO AL AUMENTO DEL CO₂ ATMOSFÉRICO. FUNCIÓN DEL NITRÓGENO Y LAS CITOQUININAS EN CULTIVOS EN CÁMARAS DE CAMPO CON CLIMA MEDITERRÁNEO”. Dicho trabajo reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de *Doctor en Biología de Salamanca*.

Y para que así conste, firman la siguiente certificación en Salamanca, a 12 de Julio de 2010.

Fdo. Dr. Rafael Martínez-Carrasco Tabuenca

Fdo. Dra. M^a Pilar Pérez Pérez

Abreviaturas:

[CO₂]	concentración de dióxido de carbono
A	velocidad de asimilación fotosintética
ARI	actividad Rubisco inicial
ART	actividad Rubisco total
ATP	adenosín trifosfato
BSA	seroalbúmina bovina
Chl a	clorofila a
Chl b	clorofila b
Chl a+b	clorofila total
Chl a:b	razón o cociente de clorofila a y clorofila b
Ci	concentración intercelular de CO ₂ del mesófilo foliar
CK	citoquinina
cv	cultivar
dda	días después de la antesis
E	velocidad de transpiración
e⁻	electrón
EC	<i>enzimic comision</i> , clave numérica que caracteriza la reacción de una enzima
FACE	<i>free air CO₂ enrichment</i> , sistemas de enriquecimiento en CO ₂ del aire libre
Fd	ferredoxina
Fv:Fm	eficiencia fotoquímica máxima del PSII
Fv':Fm'	eficiencia fotoquímica en la luz
g_s	conductancia estomática
H⁺	protón
IPCC	panel Intergubernamental de Cambio Climático de la ONU
LHC	<i>light harvesting complex</i> , antenas o complejo de captación de luz del PSII
LMA	peso seco por unidad de superficie foliar
LS	subunidad grande de la enzima Rubisco
N_A	contenido de nitrógeno por unidad de superficie
NAD⁺,NADH	nicotín-adenín dinucleótido
NADP⁺,NADPH	nicotín-adenín dinucleótido fosfato
Nd	distribución porcentual del nitrógeno entre órganos
Nt	contenido de nitrógeno por órgano
ns	no significativo
OTC	<i>open top chambers</i> , cámaras de techo abierto
Pc	plastocianina
Pf:A	peso fresco por unidad de superficie foliar
PQ	plastoquinona
Prot/A	contenido de proteína soluble por unidad de área foliar
Prot/p	contenido de proteína soluble por unidad de peso fresco

PS	fotosistema
qP	extinción fotoquímica de la fluorescencia de la clorofila
Rbco/A	contenido de proteína Rubisco por superficie foliar
Rbco/p	contenido de proteína Rubisco por peso fresco
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfato
SS	subunidad pequeña de la enzima Rubisco
TGC	<i>temperature gradient chambers</i> , cámaras de gradiente de temperatura
TP	triosas fosfato
Φ	rendimiento cuántico del transporte de electrones en el PS II
%H	porcentaje de humedad del órgano
%N	porcentaje de nitrógeno en la materia seca

Agradecimientos

“Las teorías que representan el conjunto de nuestras ideas científicas, son sin duda indispensables para representar a la ciencia y deben también servir de punto de apoyo para ideas nuevas. Pero como estas teorías y estas ideas no son la verdad inmutable, es necesario estar siempre dispuesto a abandonarlas o a cambiarlas desde el momento en que se sepa que no representan la realidad. En otras palabras: es preciso modificar la teoría para adaptarla a la naturaleza y no la naturaleza a la teoría.”

Claude Bernard, *Introducción al estudio de la medicina experimental* (1858).

Índice:	1
1. Introducción	5
1.1. El dióxido de carbono (CO ₂) y el clima	7
1.1.1. El efecto invernadero aumentado	7
1.1.2. La composición atmosférica y sus cambios pretéritos	8
1.1.3. Influencia de las actividades humanas en las variaciones climáticas	11
1.2. La fotosíntesis	14
1.2.1. Fotoabsorción y transporte de electrones	15
1.2.1.1 Transporte acíclico de electrones	19
1.2.1.2 Transporte cíclico de electrones	20
1.2.2. Fotoprotección del aparato fotosintético	21
1.2.3. Fotoasimilación del carbono	22
1.2.3.1 Características de la enzima Rubisco	24
1.3. Efectos del CO ₂ en las plantas	27
1.3.1. La aclimatación al CO ₂ elevado	29
1.3.2. Causas de la aclimatación a largo plazo	30
1.3.2.1 Implicación de la conductancia estomática (g _s) y la transpiración (E) en la aclimatación al CO ₂ elevado	31
1.3.2.2 Influencia del nitrógeno en la aclimatación al CO ₂ elevado	34
1.3.2.3 Papel de las citoquininas (CK) en la aclimatación al CO ₂ elevado	35
1.4. Propósito de la presente investigación	36
2. Objetivos	39
3. Materiales y métodos	43
3.1. Material vegetal del estudio	45
3.1.1. Especies utilizadas	45
3.1.2. Ciclo vegetativo y requerimientos edafoclimáticos	47
3.2. Diseño experimental, condiciones ambientales y muestreo	49
3.2.1. Instalaciones para el estudio del efecto del CO ₂ en el cultivo	49
3.2.2. Características de las cámaras de gradiente de temperatura (TGC)	52
3.2.3. Diseño y condiciones del experimento	56
3.2.3.1 Sitio de estudio y condiciones	56
3.2.3.2 Diseño de los experimentos	60

Indice

3.2.3.3 Toma de muestras y parámetros de crecimiento	65
3.3. Métodos de análisis	67
3.3.1. Medida de la Fotosíntesis <i>in vivo</i>	67
3.3.2. Medida de la fluorescencia de la clorofila	70
3.3.3. Determinación de clorofila	72
3.3.4. Determinación de nitrógeno total	74
3.3.5. Análisis de la actividad Rubisco	76
3.3.6. Determinación de proteína soluble y de Rubisco	79
3.4. Tratamiento estadístico de los datos	83
3.4.1. Análisis de la varianza	83
3.4.2. Análisis de paralelismo de las regresiones	83
4. Resultados	85
4.1. Análisis de la aclimatación al CO ₂ elevado en el dosel vegetal con dos suministros de nitrógeno (año 2003)	87
4.1.1. Intercambio gaseoso	87
4.1.2. Contenido de clorofila	89
4.1.3. Actividad Rubisco	90
4.1.4. Contenidos de nitrógeno	91
4.1.5. Relaciones lineales entre parámetros	94
4.2. Análisis del papel del nitrógeno y la citoquinina en la aclimatación al CO ₂ elevado (años 2006 y 2007)	96
4.2.1. Velocidad fotosintética, conductancia estomática y transpiración	96
4.2.1.1 Experimento de 2006	96
4.2.1.2 Experimento de 2007	99
4.2.2. Relación entre la conductancia de los estomas (g _s) y la fotosíntesis	104
4.2.2.1 Experimento de 2006	104
4.2.2.2 Experimento de 2007	105
4.2.3. Respuesta de la Fluorescencia de la clorofila en el año 2007	108
4.2.4. Contenidos de clorofila	111
4.2.4.1 Experimento de 2006	111
4.2.4.2 Experimento de 2007	113
4.2.5. Contenidos de proteína soluble y Rubisco	118
4.2.5.1 Experimento de 2006	118
4.2.5.2 Experimento de 2007	121

	Índice
4.2.6. Contenidos de nitrógeno	125
4.2.6.1 Experimento de 2006	125
4.2.6.2 Experimento de 2007	130
4.2.7. Parámetros de crecimiento	137
4.2.7.1 Experimento de 2006	137
4.2.7.2 Experimento de 2007	141
5. Discusión	147
5.1. Aclimatación al CO ₂ elevado en el dosel vegetal, con dos suministros de nitrógeno (año 2003)	149
5.1.1. Intercambio gaseoso	149
5.1.2. Actividad Rubisco, contenidos de nitrógeno y clorofila	150
5.2. Análisis del papel del nitrógeno y la citoquinina en la aclimatación al CO ₂ elevado (años 2006 y 2007)	153
5.2.1. Experimento de 2006	153
5.2.1.1 Intercambio gaseoso	153
5.2.1.2 Contenidos de Proteína soluble y Rubisco	156
5.2.1.3 Contenidos de nitrógeno	158
5.2.1.4 Contenido de clorofila	162
5.2.1.5 Parámetros de crecimiento	163
5.2.2. Experimento de 2007	167
5.2.2.1 Intercambio gaseoso	167
5.2.2.2 Respuesta de la Fluorescencia de la clorofila	169
5.2.2.3 Contenidos de Proteína soluble y Rubisco	171
5.2.2.4 Contenidos de Nitrógeno	172
5.2.2.5 Contenido de clorofila	174
5.2.2.6 Parámetros de crecimiento	177
6. Conclusiones	179
7. Bibliografía	185



1. Introducción

1.1. EL DIÓXIDO DE CARBONO (CO₂) Y EL CLIMA

1.1.1. El efecto invernadero aumentado

La energía solar que llega a la tierra es emitida como una mezcla de radiaciones electromagnéticas, las cuales se diferencian en sus longitudes de onda, que se encuentran entre 200 y 4.000 nm. Se distingue así entre radiación ultravioleta - de menor longitud de onda y mayor energía -, luz visible y radiación infrarroja - con la mayor longitud de onda de las tres -. Los diferentes gases y otros componentes de la atmósfera no absorben de igual forma estos tipos de radiaciones solares. En ausencia de cualquier atmósfera, la temperatura superficial de la tierra sería de -18 °C. Sin embargo, la temperatura media de la superficie terrestre es de 15 °C, ya que existe un 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, algunos gases y polvo que componen la atmósfera, otra parte es retenida por ella y un 45% atraviesa la atmósfera sin ser absorbida y puede llegar a la superficie del planeta (Larcher, 2003).

Las moléculas heteroatómicas que forman parte de la atmósfera como vapor de agua, dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y óxidos de nitrógeno, son transparentes a las radiaciones de longitud de onda corta - ultravioletas y visibles - y por lo tanto éstas pueden atravesar la atmósfera, mientras que absorben las radiaciones solares de onda larga - radiación infrarroja principalmente -. La energía solar en forma de radiación de onda corta después alcanza la troposfera y es absorbida por la tierra y océano, cuerpos que al absorberla y calentarse emiten energía calorífica en forma de radiación en el infrarrojo, que en lugar de perderse al espacio será absorbida por dichos gases. Este fenómeno llamado *efecto invernadero* permite que la temperatura terrestre se mantenga dentro de unos márgenes no muy amplios, lo cual ha sido indispensable para la aparición y desarrollo de la vida. A la par que comenzó la revolución industrial en 1750, la concentración de CO₂ - [CO₂] - aumentó de 280 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, hasta superar hoy día los 388 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Fig. 1.1.1), con un incremento actual de aproximadamente 2,1 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ año⁻¹ (<http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>). Así, la concentración actual de CO₂ en la atmósfera ha alcanzado los niveles más altos en 800.000 años (Tripathi *et al.*, 2009) y se espera que esta tendencia continúe. Los aumentos globales de los niveles de CO₂ atmosférico actuales se deben principalmente al uso de combustibles fósiles y a la transformación del uso de la tierra. Por otro lado, los aumentos de la concentración de CH₄,

Introducción

que también ha alcanzado niveles desconocidos desde hace 650000 años, y de óxido nítrico (Fig. 1.1.1, Fig. 1.1.3); son debidos principalmente a la agricultura y la ganadería (IPCC 2007 y 2007b).

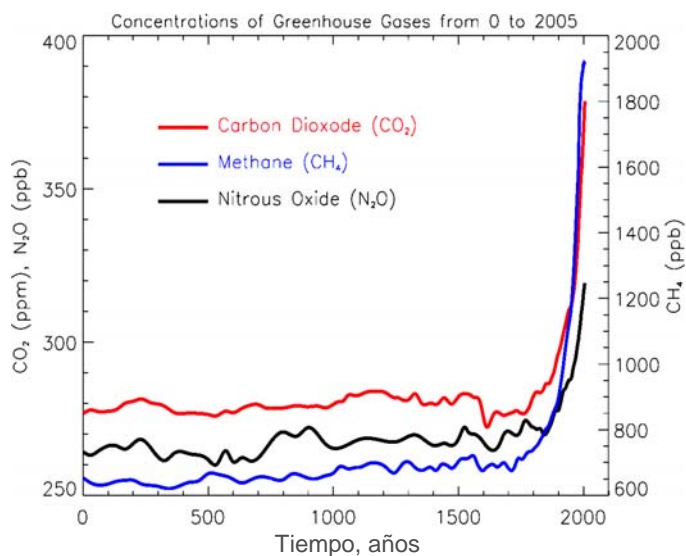


Figura 1.1.1 Concentraciones atmosféricas de dióxido de carbono (CO₂, línea roja), metano (CH₄, línea azul) y óxido de nitrógeno (N₂O, línea negra) a lo largo de los últimos dos milenios. Las unidades son partes por millón (ppm) o $\mu\text{mol mol}^{-1}$ y partes por billón (ppb). Fuente: IPCC 2007.

El sistema climático tiene interacciones complejas en las que una pequeña perturbación inicial por retroalimentación positiva puede acabar desencadenando fenómenos de magnitudes crecientes. Por ejemplo, si pensamos en el incremento del CO₂ por la quema de combustibles fósiles, a la vez que el hombre ha reducido los bosques - que absorben dicho gas -, el desequilibrio causado aumentará las [CO₂] atmosféricas. Si la adición de CO₂ a la atmósfera aumenta levemente la temperatura, se espera que más vapor de agua se evapore desde la superficie de los océanos y dicho vapor de agua al absorber radiación infrarroja aumentará a su vez el efecto invernadero; habrá reducciones de hielo marino que aumentará la absorción de calor por el océano y la suma de muchos factores puede provocar que las temperaturas se eleven de forma constante (Briffa & Osborn, 2009), como sucede desde el siglo XIX (Fig. 1.1.4).

1.1.2. La composición atmosférica y sus cambios pretéritos

La atmósfera actual presenta una composición gaseosa muy diferente a la que tuvo en el pasado y a la del resto de planetas que comparten características como distancia respecto al Sol, tamaño y materiales de origen; llamados “planetas terrestres”. Al enfriarse la corteza

terrestre primitiva, hubo una etapa de emisión y liberación de gases que estaban disueltos en las rocas fundidas. La atmósfera inicial, con una composición similar a las atmósferas de planetas como Venus y Marte, estaría formada fundamentalmente por CO₂, nitrógeno gaseoso (N₂) y vapor de agua, junto con CH₄ y escasa presencia del O₂, debido a que este gas reacciona con los minerales terrestres y precipita. El aumento en la concentración de O₂ fue un resultado de la fotosíntesis oxigénica, proceso en el que gracias a la energía solar, el CO₂ y el hidrógeno obtenido del agua se emplean para generar materia orgánica liberando O₂. La fotosíntesis se debe a la actividad de los seres vivos fotoautótrofos: organismos capaces de sintetizar todas las sustancias esenciales para su metabolismo a partir de sustancias inorgánicas y la luz solar - véase apartado 1.2 -, de manera que para su nutrición no necesitan de otros seres vivos y por esta razón son una parte esencial en la cadena alimentaria, ya que otros seres vivos utilizarán a los autótrofos como alimento (Lawlor, 2005). Los primeros organismos fotosintéticos aportaron una pequeña concentración inicial de O₂ a la atmósfera, antes de acontecer lo que los geólogos llaman el Gran Evento de Oxidación, fenómeno debido a la aparición y multiplicación de autótrofos pluricelulares como algas que sucedió hace entre unos 2300 y 2400 millones de años (Scott *et al.*, 2008). Este cambio en la composición de la atmósfera provocó la extinción de muchas formas de vida adaptadas a vivir en un ambiente sin O₂. A su vez, la mayor concentración de este gas permitió la aparición sucesiva de otras formas de vida más complejas.

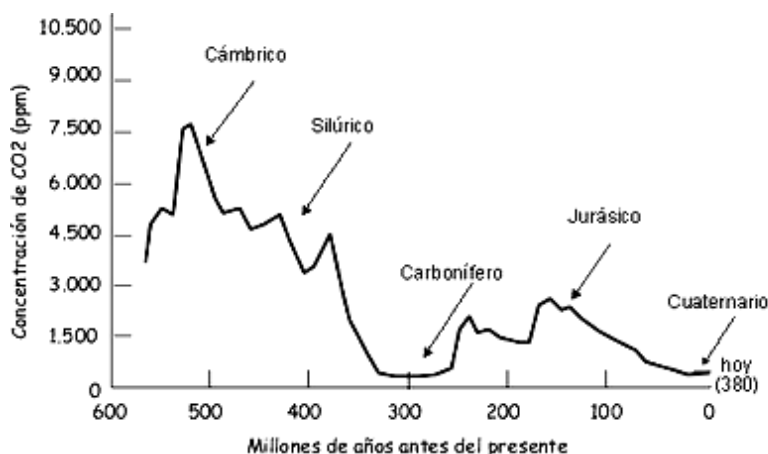


Figura 1.1.2 Variaciones de los niveles de CO₂ atmosférico a lo largo del Eón Fanerozoico, basadas en estimaciones de la meteorización de silicatos. Adaptado de Berner & Kothavala, 2001

Introducción

A mediados del Silúrico, ocurrió un fenómeno biológico fundamental: aparecieron las plantas vasculares, plantas con tallos rígidos y tejidos conductores hechos con una nueva sustancia orgánica, la lignina, que les dio el soporte estructural necesario para poder crecer en vertical, y así hubo otro nuevo aumento del O₂ que permitió la colonización de las tierras emergidas por organismos que evolucionaron en estas fechas desde formas acuáticas a terrestres (Ward *et al.*, 2006). La aparición de los árboles y desarrollo de bosques se acompañó de más cambios en la composición atmosférica y así hace unos 300 millones de años, el CO₂ del aire fue decreciendo hasta un nivel muy bajo (Fig. 1.1.2), semejante al de ahora, probablemente debido a que gran parte del CO₂ atmosférico fue convertido por la fotosíntesis en carbono orgánico (Berner, 1999) y pasó a formar los depósitos de carbón y petróleo debido al enterramiento de restos vegetales por los movimientos tectónicos y las posteriores altas temperaturas y presiones a las que fueron sometidos. En la era secundaria - desde los 245 hasta los 65 millones de años - la [CO₂] era varias veces superior a la actual por la intensa desgasificación volcánica (Fig. 1.1.2). Durante el transcurso de la última parte del Cretácico, hace unos 65 millones de años, la concentración de CO₂ atmosférico disminuyó de nuevo considerablemente y el clima se enfrió bastante. La evolución climática del Cenozoico, que comenzó hace 65 millones de años y comprende las eras Terciaria y Cuaternaria, es compleja. Se pasó de un clima cálido, a un clima frío final, con glaciaciones que cíclicamente han recubierto de hielo extensas zonas continentales durante los 2 últimos millones de años. Dicho enfriamiento vino acompañado por una pérdida casi continua de CO₂ atmosférico, que pasó de 2000 a una concentración siempre por debajo de los 500 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ desde hace unos 20 millones de años (Fig. 1.1.2) e inferiores a 300 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ durante el último millón de años (Pagani *et al.*, 2005). A comienzos del Pleistoceno, las aguas oceánicas entraron en una última fase de enfriamiento. Desde entonces, el clima ha estado marcado por una sucesión continua de glaciaciones y períodos interglaciales acompañados por oscilaciones de la [CO₂] en la atmósfera (Fig. 1.1.3). Los seres vivos han tenido que adaptarse a concentraciones muy variables tanto de CO₂ como de O₂, y estas variaciones son debidas en parte a la actividad de dichos organismos autótrofos (Grace *et al.*, 1997).

1.1.3. Influencia de las actividades humanas en las variaciones climáticas

Cambio climático es un cambio a largo plazo en las condiciones climáticas normales - temperatura y precipitación principalmente - para un lugar y época del año dados. Los cambios climáticos son frecuentes a lo largo de la historia de la tierra y se deben entre otras razones, a modificaciones de las proporciones de gases atmosféricos (Fig. 1.1.2, Fig. 1.1.3) provocados por causas endógenas como erupciones volcánicas o la aparición de los primeros bosques (Scott & Glasspool, 2006) y exógenas, como impactos de meteoritos, los rayos cósmicos (Svensmark, 2007; Lu, 2009) o las variaciones solares.

El Sol puede influir en el clima terrestre de muchas maneras, ya que la producción de energía solar y su campo magnético no son constantes, y éste modula la llegada de rayos cósmicos, modifica la capa de ozono y también llegará más o menos energía a la Tierra. Las variaciones solares son fluctuaciones en la cantidad de energía emitida por el Sol, la más conocida es la de los ciclos de las manchas solares, de unos 11 años de duración y donde existe un máximo y un mínimo. A finales del siglo XVII hubo un período de baja actividad solar - el “Mínimo de Maunder” - que coincidió con una época de condiciones climáticas muy frías en Europa llamada la Pequeña Edad de Hielo, y terminó coincidiendo con los inicios de la revolución industrial y el consiguiente aumento de gases de efecto invernadero (Briffa & Osborn, 2009). Sin embargo, si los cambios solares fueran la causa actual, hoy en día troposfera y estratosfera deberían calentarse, y en realidad la estratosfera se ha enfriado (IPCC 2007). En suma, todavía no se ha demostrado perfectamente la correlación entre los ciclos solares y el clima terrestre e incluso si se acepta que el Sol ha sido responsable de las oscilaciones climáticas anteriores a 1970, a partir de este año las variaciones solares sólo podrían explicar un 30% del aumento de la temperatura global registrada (Krivova & Solanki, 2004).

La pregunta a la que se quiere responder es si las actividades humanas están afectando al ciclo global del carbono y aumentando el efecto invernadero, siendo el hombre responsable de un nuevo cambio climático (IPCC 2001, 2007). Como observamos en la figura 1.1.2 el CO₂ ha tenido en el pasado concentraciones atmosféricas mayores que las actuales, pero en esas épocas pretéritas había otro equilibrio entre los distintos componentes del clima (Kasting *et al.*, 2005), otras especies de organismos cuya actividad modificaba los ciclos del carbono (Berner, 1997; Lenton & Watson, 2004), otra disposición de las tierras emergidas debido a la deriva continental y también la energía enviada por el Sol era menor que la recibida hoy día (Kaufman & Xiao, 2003). Ha habido periodos donde la concentración de

Introducción

este gas era mayor que la actual, incluso superaba los $5000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (Fig. 1.1.2), mientras que en otras etapas la concentración de CO_2 era menor que la actual, observándose una disminución de su concentración desde que se establecieron las primeras plantas vasculares en el Silúrico, tras lo cual no se han observado concentraciones mayores de $2000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (Fig. 1.1.2), y así la $[\text{CO}_2]$ se ha mantenido dentro de ciertos niveles a través de la removilización por la fotosíntesis y de otros procesos geológicos y biológicos.

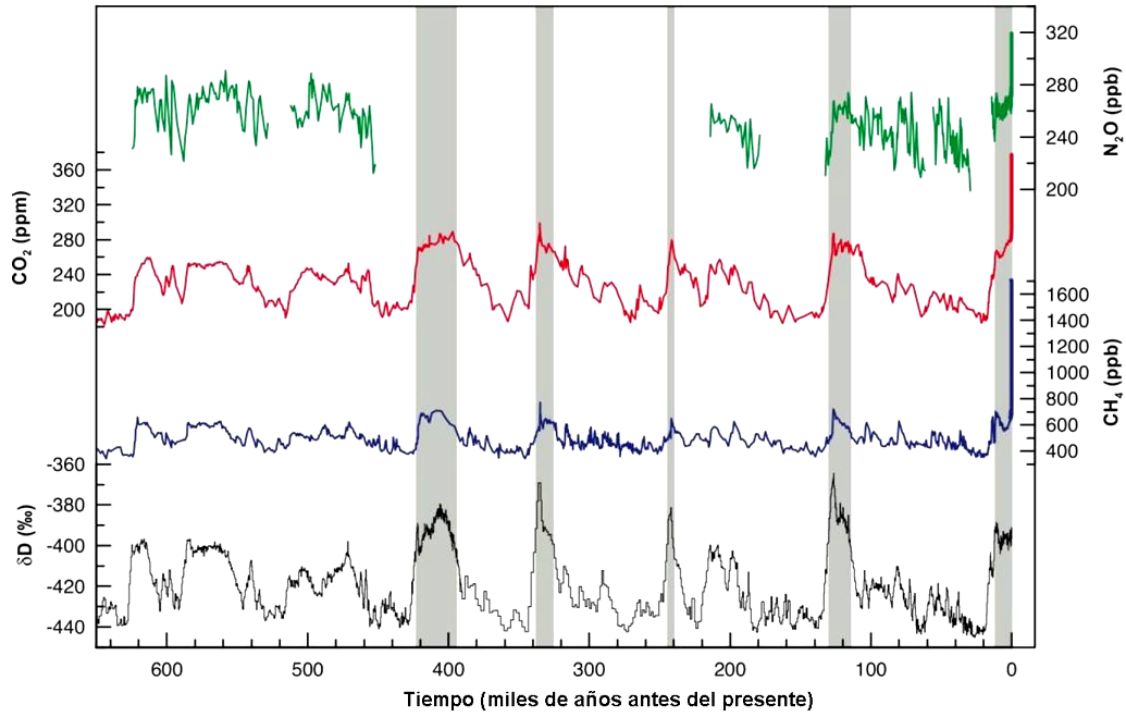


Figura 1.1.3 Variaciones del deuterio (δD) en los hielos de la Antártida - que es una aproximación a los valores de temperatura locales - y concentraciones atmosféricas de los gases de efecto invernadero CO_2 , metano (CH_4) y óxido de nitrógeno (N_2O) en el aire atrapado en testigos de hielo y de mediciones actuales. Las bandas verticales grises señalan los periodos interglaciares cálidos. Adaptado de IPCC 2007b

Como vemos en la figura 1.1.3, los periodos glaciares se acompañaron de $[\text{CO}_2]$ cercanas a $200 \mu\text{mol mol}^{-1}$ y en los interglaciares se alcanzaban $280 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (Petit *et al.*, 1999; Tripati *et al.*, 2009). En los últimos 800.000 años los cambios de $[\text{CO}_2]$ se encuentran muy acoplados a las oscilaciones de temperatura y nivel del mar que acompañaban a glaciaciones y periodos interglaciares (Tripati *et al.*, 2009). En el periodo interglaciar actual se dieron periodos cálidos y fríos independientes de los niveles de CO_2 atmosférico, indicando que éste no es la única causa de las variaciones térmicas; sin embargo a las concentraciones actuales, este gas sí podría estar afectando la temperatura global llegando a desencadenar un nuevo cambio del clima (Solomon *et al.*, 2009; Tripati *et al.*, 2009), ya que el calentamiento observado durante el siglo XX (Fig. 1.1.4) no se explica solamente por causas naturales (Crowley *et al.*, 2000).

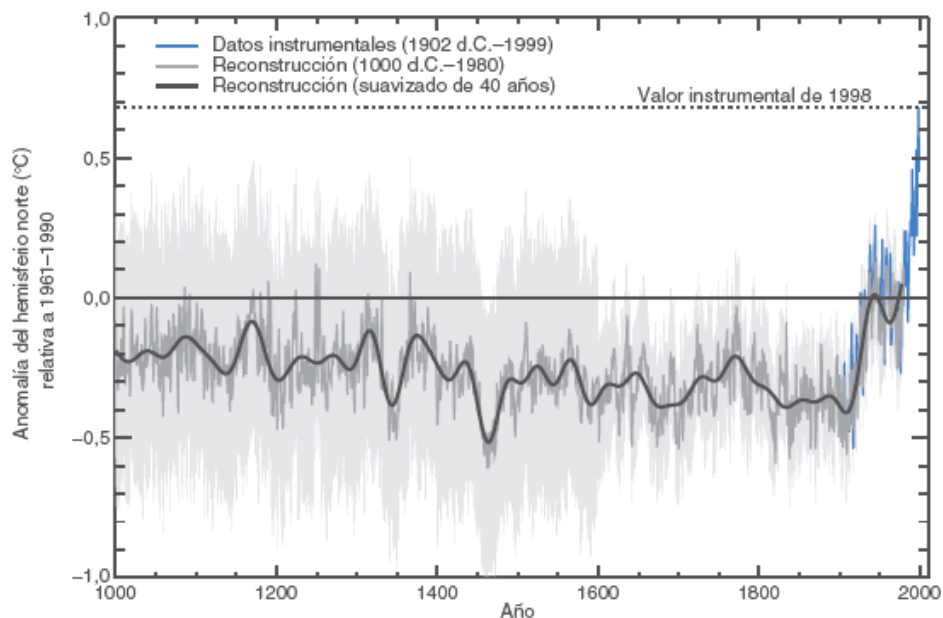


Figura 1.1.4 Reconstrucción de la temperatura del hemisferio norte basado en los anillos de crecimiento de árboles, corales, muestras de hielo y registros históricos - gris oscuro - y datos instrumentales - azul - desde 1000 hasta 1999. Fuente: IPCC 2001

Las actividades humanas pueden no sólo influir en el ciclo global del carbono y por consiguiente modificar el clima; la intensificación de la actividad agrícola y la combustión de carburantes fósiles también aumentan en la atmósfera formas de nitrógeno distintas del N_2 (Vitousek *et al.*, 1997). El nitrógeno es un nutriente limitante en casi todos los ecosistemas, ya que el N_2 atmosférico no está disponible para la mayoría de los organismos y se requiere un proceso de fijación con gasto de energía para convertirlo en otras formas asimilables (Galloway *et al.*, 1998). Las actividades agrícolas liberan en la atmósfera

Introducción

amoníaco (NH_3) y óxido nitroso (N_2O) principalmente (Fig. 1.1.1, Fig. 1.1.3), a su vez de la combustión de carburantes fósiles se desprende monóxido y dióxido de nitrógeno - NO y NO_2 respectivamente -. Estos gases pasado un tiempo vuelven a depositarse y provocan daños, tanto en el océano como en el medio terrestre - acidificación del suelo, pérdida de diversidad, eutrofización, etc. -. Por todo esto, la alteración del ciclo del nitrógeno junto con el aumento de CO_2 son dos factores importantes para entender el efecto de las actividades humanas en la biosfera (Cubasch *et al.*, 2001). Zalasiewicz *et al.* (2008) afirman: "...sugerimos que las condiciones ambientales típicas de los tiempos preindustriales del Holoceno, han cambiado lo suficiente como para encontrarnos en los comienzos de otra época geológica". Las plantas, y por tanto casi todos los ecosistemas existentes, así como los cultivos agrícolas, se verán afectados y deberán adaptarse a estos rápidos cambios.

1.2. LA FOTOSÍNTESIS

La radiación solar es la fuente primaria de energía para la vida en la tierra (Taiz & Zeiger, 2002; Heldt *et al.*, 2005) y se incorpora a la biosfera por medio de la fotosíntesis, un proceso biológico fundamental para la vida mediante el cual se produce la conversión de energía luminosa en energía química (Medrano & Flexas, 2000). Además de ser colector de energía actual, gran parte de las reservas energéticas del planeta son resultado de procesos fotosintéticos anteriores - combustibles fósiles - (Taiz & Zeiger, 2002). La fotosíntesis de las algas y plantas eucariotas tiene lugar en los cloroplastos, orgánulos de doble membrana con un sistema interno de membranas llamadas **tilacoides** embebidas en un medio hidrofílico - *estroma* -. Los tilacoides - al no estar conectados con la membrana interna - encierran en su interior un espacio acuoso llamado *lumen* (Lawlor, 1987; Mustárdy, 1996).

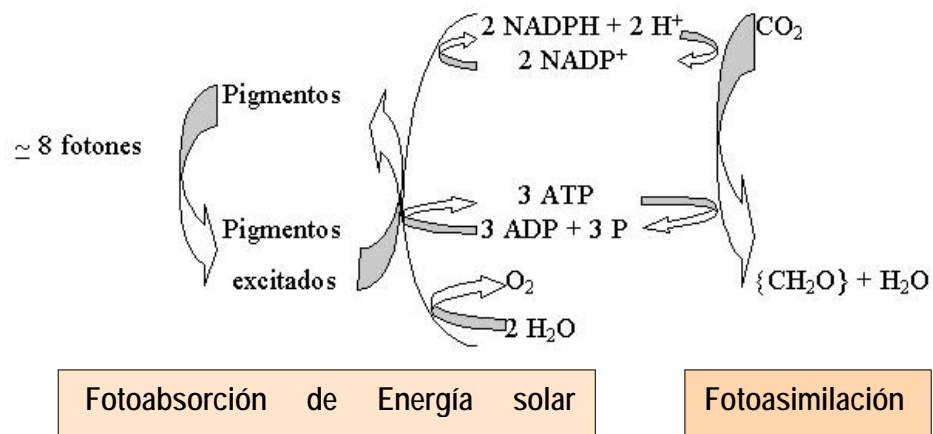


Figura 1.2.1 Representación esquemática de las etapas principales de la fotosíntesis. La absorción de la luz produce la excitación de los pigmentos fotosintéticos. Los electrones son transferidos a través de una serie de moléculas para liberar poco a poco su carga energética hasta que el NADP^+ se reduce a NADPH y la formación de ATP también está acoplada a la transferencia de electrones. Con la energía acumulada en estas moléculas se lleva a cabo la reducción del CO_2 a azúcares - $(\text{CH}_2\text{O})_n$ - o fotoasimilación. Adaptado de Nobel, 1991.

El proceso fotosintético comprende dos grandes fases (Fig. 1.2.1): la captación de la energía solar - compuesta por paquetes energéticos indivisibles llamados fotones - para dar lugar a la síntesis de energía química en forma de ATP y poder reductor (NADPH), y la utilización de estos productos altamente energéticos para reducir los elementos constitutivos de la materia orgánica (C, H, O, N, S...) tomados de fuentes inorgánicas - agua, CO_2 atmosférico, nitratos, sulfatos etc. - e incorporarlos a la materia orgánica (Nobel, 1991; Lawlor, 2005). Ambos procesos están relacionados y son dependientes de luz, por lo que la vieja nomenclatura de fase lumínica y fase oscura está en desuso, siendo más conveniente hablar de fase de **fotoabsorción** - de energía - y de fase de **fotoasimilación** - de elementos esenciales -.

1.2.1. Fotoabsorción y transporte de electrones

Cuando un fotón incide sobre un átomo o una molécula capaz de absorber luz a una determinada longitud de onda, se produce una absorción de energía por parte de algunos de los electrones (e^-) de esta molécula, que se mueven a niveles de energía superiores - excitación molecular -. Esto supone un cambio a un estado electrónico altamente inestable de la molécula que lo ha absorbido, por lo que tendrá una gran tendencia a soltar esa energía - relajación o desexcitación - volviendo a su estado fundamental de menor energía. La vuelta al estado inicial, con emisión de un fotón energéticamente idéntico, es muy

Introducción

improbable, ya que parte de la energía de excitación se pierde en forma de calor. Algunas moléculas - como las clorofilas - pueden emitir fotones de energía menor a la recibida en forma de fluorescencia (De las Rivas, 2000). Otro tipo de relajación supone la transferencia de energía a otra molécula suficientemente cercana por transferencia excitónica o la pérdida del electrón excitado, que será captado por otra molécula - aceptor electrónico -.

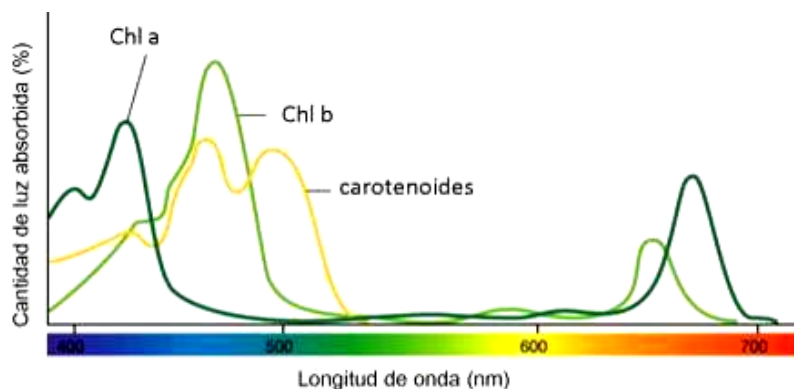


Figura 1.2.2 Espectros de absorción de luz de los principales pigmentos fotosintéticos de las plantas superiores: clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b) y carotenoides. Fuente: Taiz & Zeiger, 2002.

Las moléculas que se excitan en fotosíntesis son los pigmentos. Las células fotosintéticas contienen tres tipos de pigmento que captan la luz: las clorofilas - los más abundantes -, los carotenoides y las ficobilinas. Los pigmentos fotosintéticos son moléculas con una gran capacidad de absorción de la energía de los fotones (Fig.1.2.2) gracias a sus numerosos dobles enlaces. La clorofila es el principal pigmento absorbente de luz en la mayor parte de las plantas superiores, que contienen principalmente dos tipos de clorofila (Fig.1.2.2), designadas como clorofila a (Chl a) y clorofila b (Chl b) .

Los pigmentos que absorben la luz, se hallan unidos a proteínas para formar complejos pigmento-proteína (Taiz & Zeiger, 2002; Heldt *et al.*, 2005). Existen dos tipos de complejos pigmento-proteína: los que tienen exclusivamente la misión de recolectar la energía - antenas - y los que sirven como trampa final de la energía - centros de reacción - (Fig. 1.2.3). La diferencia entre las antenas y los centros de reacción estriba en que las antenas transfieren la energía de excitación procedente de la luz, es decir, hay transferencia de energía, no de e^- . Por el contrario, en los centros de reacción se produce transferencia de e^- - separación de carga o reacción fotoquímica primaria - convirtiendo la energía luminosa en energía redox (Fig. 1.2.3), la cual, gracias al concurso de la cadena de transporte de e^- , se convertirá en energía química, como veremos a continuación.

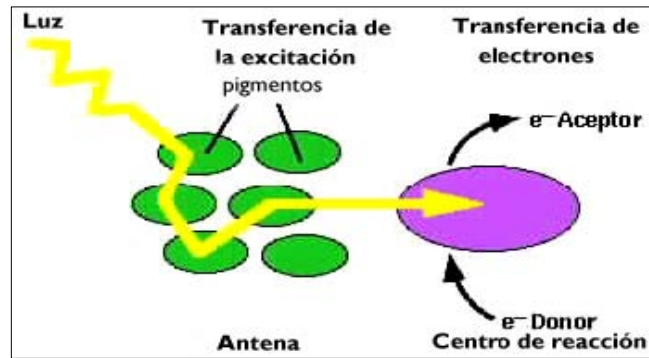


Figura 1.2.3 Transferencia de la energía luminosa captada por la antena hasta los centros de reacción del PS, donde se da la separación de carga o transformación de flujo fotónico en flujo electrónico. Adaptado de Taiz & Zeiger, 2002

El aparato fotosintético (Fig. 1.2.4) está constituido por diferentes complejos proteicos de gran tamaño y complejidad embebidos en las membranas tilacoidales dentro de los cloroplastos y una serie de moléculas de naturaleza lipídica - plastoquinonas (PQ)- o proteica - plastocianina (Pc), ferredoxina (Fd) y ferredoxina-NADP⁺ oxido-reductasa (FNR) - (De las Rivas, 2000) que absorberán la energía luminosa y realizarán el transporte de e⁻ y la translocación de protones (H⁺):

- Los fotosistemas (PS): Son las unidades básicas para la realización de la fotosíntesis, capaces de absorber y transformar la energía fotónica en química (Fig. 1.2.3). Las plantas tienen dos fotosistemas, **PSI** - Pc / Fd óxido reductasa - y **PSII** - H₂O / PQ óxido reductasa - (De las Rivas, 2000). Además del centro de reacción - llamado P700 en el PSI y P680 en el caso del PSII - (Fig. 1.2.3, 1.2.4), los PS poseen las antenas colectoras de luz (LHC, del inglés *Light Harvesting Complex*), LHC I asociada al PSI y LHC II, asociada al PSII - aunque también puede hacerlo con el PSI - (Taiz & Zeiger, 2002). El movimiento de la antena LHCII entre el PSII y el PSI permite regular la energía captada para conseguir el trabajo en serie de estos PS durante el transporte acíclico de e⁻. LHCII normalmente transfiere la energía al PSII. Cuando hay exceso de energía, todo el pool de plastoquinonas se reduce, esto activa una quinasa que fosforila a LHCII. En forma fosforilada, la antena no se asocia al PSII, sino al PSI - trasladando a él la toma de energía -, y permitiendo que se oxiden las plastoquinonas.

- Plastoquinona (PQ): molécula de carácter anfipático capaz de reducir los grupos ceto de su anillo quinona a hidroxilo para dar plastoquinol que liberará H⁺ al lumen (Fig. 1.2.4), disminuyendo el pH del mismo. Existen del orden de 10 moléculas por PSII, por lo que se utiliza la expresión inglesa *pool* - reserva - de PQ. La PQ conecta el PSII con el complejo

Introducción

citocromo b_6/f y ejerce un papel regulador de la cadena de transporte electrónico, así como de punto de cruce con otras vías redox.

- Complejo citocromo b_6/f : conecta los dos PS, oxidando el plastoquinol producido por el PSII, y reduciendo la Pc, que posteriormente oxidará al PSI. Los dos H^+ del plastoquinol se translocan al lumen y los dos e^- pasan a Pc, que toma dos H^+ del estroma (Fig. 1.2.4).
- Plastocianina (Pc): pequeña proteína redox que se asocia a la cara del lumen de la membrana tilacoidal y conecta el complejo cit. b_6/f con el PSI (Fig. 1.2.4).
- Ferredoxina (Fd): proteína con capacidad redox que se asocia a la cara estromática de los tilacoides y es aceptor de los e^- del PSI. Actúa como distribuidor de e^- a otros sistemas redox, entre otros a la FNR (Fig. 1.2.4) - que reducirá al $NADP^+$ -.
- Ferredoxina $NADP^+$ oxido-reductasa (FNR): capaz de generar poder reductor al reducir el $NADP^+$ a NADPH, tomando 2 e^- de la Fd reducida y un H^+ del estroma, con el consiguiente aumento del pH, que contribuye a aumentar la diferencia de pH entre estroma y lumen (Fig. 1.2.4).
- ATP sintasa: encargada de sintetizar ATP, gracias al gradiente de H^+ originado por el flujo electrónico de los tilacoides (Fig. 1.2.4).

1.2.1.1 Transporte acíclico de electrones

La formación de ATP acoplada a la reducción de NADP^+ se denomina *fotofosforilación acíclica*. La energía de excitación que llega al PSII es transformada en energía electroquímica redox y comienza una cadena de transporte lineal o acíclico de e^- explicada por Hill y Bendall en 1960 con el llamado *esquema en Z* (Fig. 1.2.4), que sintetiza el proceso de transferencia electrónica desde el agua - donador primario de e^- - del lumen tilacoidal al NADP^+ - aceptor final - que pasará a NADPH si la Fd reducida por el PSI los cede a la FNR.

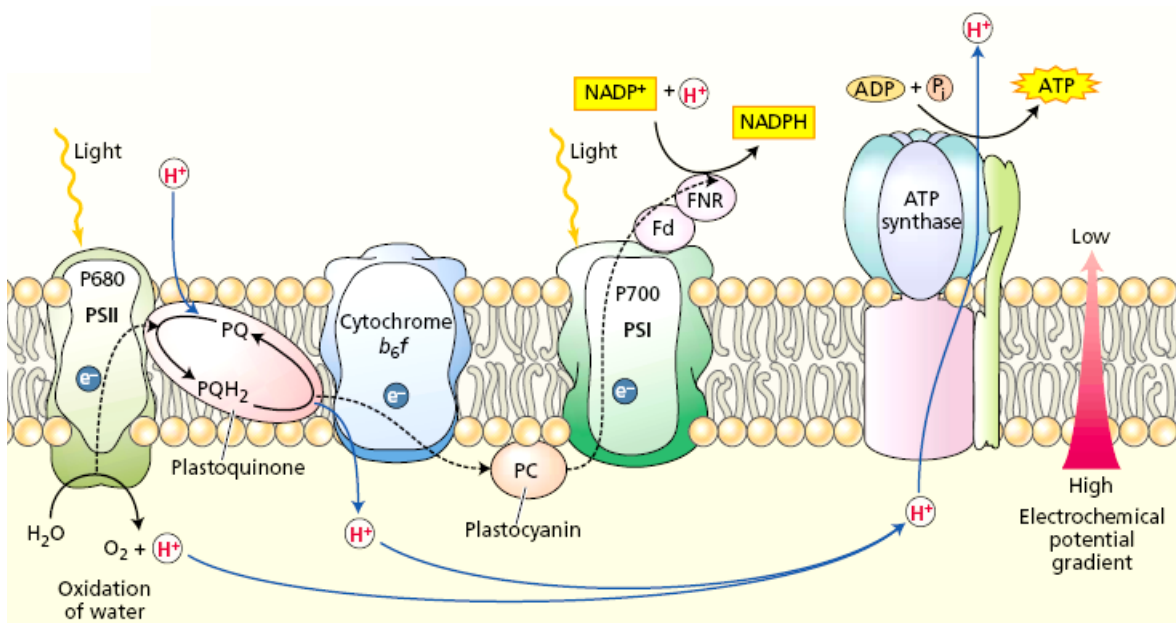


Figura 1.2.4 Esquema de una membrana tilacoidal donde se produce el transporte acíclico de e^- - flechas discontinuas - que reducirá el NADP^+ y la translocación de H^+ - flechas azules - que generará el gradiente de potencial electroquímico acoplado a la síntesis de ATP. Véase el texto para más detalles. Fuente: Taiz & Zeiger, 2002.

El proceso global se inicia mediante la obtención de los e^- provenientes de la fotólisis del agua - cuatro e^- por molécula de O_2 formada, es decir por dos moléculas de H_2O -. El centro de reacción del PSII (P680) es excitado por fotones con un máximo a una longitud de onda de 680 nm, que incrementan su potencial redox, produciendo la primera liberación electrónica. La fotoliasa del agua asociada al PSII posee un centro de reacción con cuatro átomos de Manganeseo - complejo liberador de O_2 -, que se van oxidando sucesivamente - dando los e^- al PSII - hasta llegar a tener un poder oxidante suficiente como para poder romper la molécula de agua liberando los H^+ al lumen, tomando los e^- para iniciar la cadena de transporte acíclico de e^- y la translocación de H^+ que también habrá en varios puntos de

Introducción

la cadena (Fig. 1.2.4). La elevada energía que requiere la transferencia de e^- desde la Pc para reducir la Fd oxidada - realizada por el PSI - también proviene de la luz (Fig. 1.2.4). Esta Fd reducida, además de reducir al $NADP^+$ con el concurso de la FNR, tiene otras funciones en el cloroplasto como fuente de poder reductor en la reducción del nitrato o en el control de enzimas de la fijación de carbono.

Los H^+ liberados durante la fotólisis del agua junto con los translocados durante el transporte electrónico (Fig. 1.2.4) crean un gradiente protónico entre el lumen y el estroma que será utilizado para la síntesis de ATP. 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).

1.2.1.2 Transporte cíclico de electrones

En el transporte acíclico por cada NADPH se translocan cuatro H^+ , lo que produce la formación de 1.33 moléculas de ATP - debidas la translocación de tres H^+ por la ATP sintasa -, pero las proporciones entre ATP y NADPH que requiere cada posterior ruta biosintética no coinciden con dicha proporción (De las Rivas, 2000). Por ejemplo en la reducción de una molécula de CO_2 en la fase de fotoasimilación se requiere dos moléculas de NADPH y tres moléculas de ATP.

Ese ATP adicional puede obtenerse del funcionamiento cíclico de los e^- en torno a un PS (Fig. 1.2.5), cerrando un ciclo que sólo producirá un incremento del gradiente de H^+ - que será utilizado en la *fotofosforilación cíclica del ATP* -. El transporte cíclico de e^- permite por tanto, utilizar la energía luminosa para producir ATP sin formar NADPH y se da normalmente en torno al PSI (De las Rivas, 2000) cuando la Fd en lugar de transferir e^- al NADPH, lo realiza hacia el complejo citocromo b_6/f , con el consiguiente bombeo de H^+ y reducción de Pc, que al ser oxidada por el PSI cierra el ciclo (Fig. 1.2.5). Esta fotofosforilación cíclica del ATP es menos eficiente energéticamente que la obtenida con el flujo lineal, ya que una parte importante de la energía se pierde en forma de calor, por lo que también estos flujos cíclicos se consideran procesos de disipación activa de la energía - permiten disipar el exceso de energía que podría dañar el aparato fotosintético bajo situaciones de estrés o de menor demanda energética -.

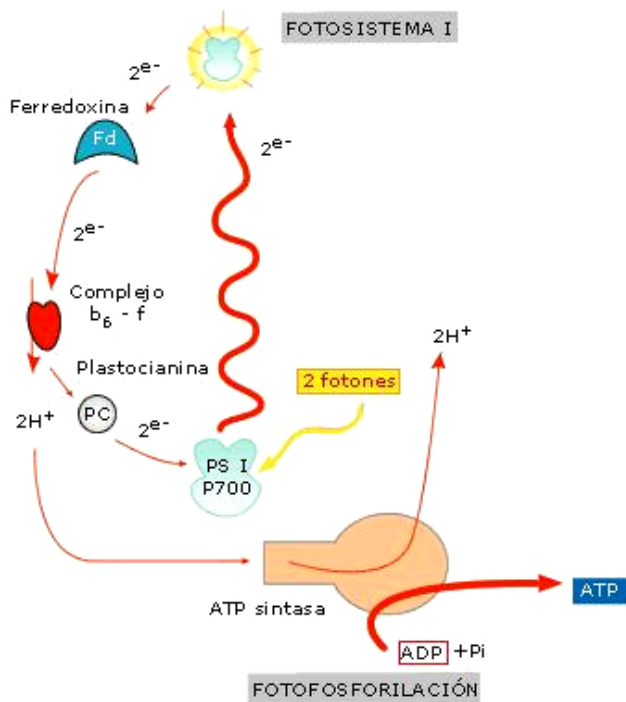


Figura 1.2.5 Esquema del transporte cíclico de e^- en torno al PSI con la consiguiente fotosíntesis de ATP. Adaptado de Heldt *et al.*, 2005

1.2.2. Fotoprotección del aparato fotosintético

A pesar de que las reacciones que convierten la energía luminosa absorbida por los pigmentos en energía química tienen un gran rendimiento, la capacidad de estas reacciones es limitada. Por otro lado, la velocidad de las reacciones fotoquímicas o rendimiento cuántico electroquímico debe estar muy coordinada con la velocidad de asimilación fotosintética (A). Al existir numerosos factores ambientales que pueden limitar la capacidad de las plantas para utilizar la energía que proviene de la luz y provocar desajustes entre estas dos variables, se hace necesario que existan mecanismos de fotoprotección para disipar la energía de excitación absorbida por la antena y que no puede usarse en las reacciones fotoquímicas, y así proteger el aparato fotosintético (Heldt *et al.*, 2005). La luz absorbida por los pigmentos fotosintéticos sigue dos vías: puede ser utilizada en las reacciones fotoquímicas - extinción fotoquímica (qP) -, o bien ser disipada en forma de fluorescencia o como energía térmica. Estas vías están en continuo equilibrio y en relación inversa, de forma que cuando aumenta la primera disminuye la segunda (Butler, 1978, Baker, 2008). Los pigmentos están dispuestos para transmitir rápidamente la energía de su estado excitado hasta los centros de reacción, pero si hay exceso de energía luminosa se dan modificaciones estructurales de las antenas que aumentan la emisión de fluorescencia - reemisión de luz con

Introducción

mayor longitud de onda que la absorbida -. A temperatura ambiente, la mayor parte de la emisión de fluorescencia se debe a la Chl a del PSII (Krause y Weis, 1991). La fluorescencia emitida refleja la actividad fotosintética y cualquier factor ambiental que reduzca la actividad fotosintética provoca cambios en los parámetros de fluorescencia, por lo que su medición constituye una herramienta muy útil en áreas como fisiología y ecofisiología vegetal y es en la práctica, uno de los pocos métodos no destructivos que existen para el análisis de muchos fenómenos fisiológicos (Krause y Weis, 1984, Baker, 2008). La medición de estos parámetros con las **técnicas de fluorescencia de pulsos de amplitud modulada** - véase apartado 3.2.2 - proporcionará información sobre el estado funcional del aparato fotosintético, y más específicamente del PSII (Schreiber *et al.*, 1986).

La fotoprotección es necesaria debido a que un exceso de energía luminosa absorbida por los PS puede agotar los sustratos terminales de la cadena de e^- , deteniendo el transporte electrónico para, a continuación, dañar a sus componentes - fotoinhibición - y afectar al crecimiento (Krause, 1988). Las plantas, además de la emisión de calor y fluorescencia, tienen otros mecanismos para disipar dicho exceso, por ejemplo, los carotenoides además de su papel como colectores de fotones en las antenas, tienen una importante función de fotoprotección de los componentes del aparato fotosintético, mediante la absorción de energía de las clorofilas excitadas y posterior disipación a través del ciclo de las xantofilas (Frank *et al.*, 1996; Eskling *et al.*, 1997). Los flujos cíclicos de transporte electrónico y la fotorrespiración - véase apartado 1.2.3.1 - también participan en la protección de aparato fotosintético por la disipación energética como calor y su consumo de ATP y NADPH (Osmond *et al.*, 1997), permitiendo regenerar los sustratos terminales de la cadena - ADP y $NADP^+$ -.

1.2.3. Fotoasimilación del carbono

Con excepción de algunas bacterias fotosintéticas, el CO_2 es convertido en materia orgánica a través del **ciclo de Benson-Calvin**, gracias a la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa o Rubisco (E.C. 4.1.1.49), independientemente de si su metabolismo es tipo C3, C4 o CAM - ver apartado siguiente -. El Ciclo de Benson-Calvin (Fig. 1.2.6) tiene lugar en el estroma del cloroplasto y comprende once enzimas que catalizan trece reacciones que utilizan el ATP y el NADPH en la fijación del CO_2 atmosférico para originar esqueletos carbonados (Woodrow & Berry, 1988; Geiger & Servaites, 1994).

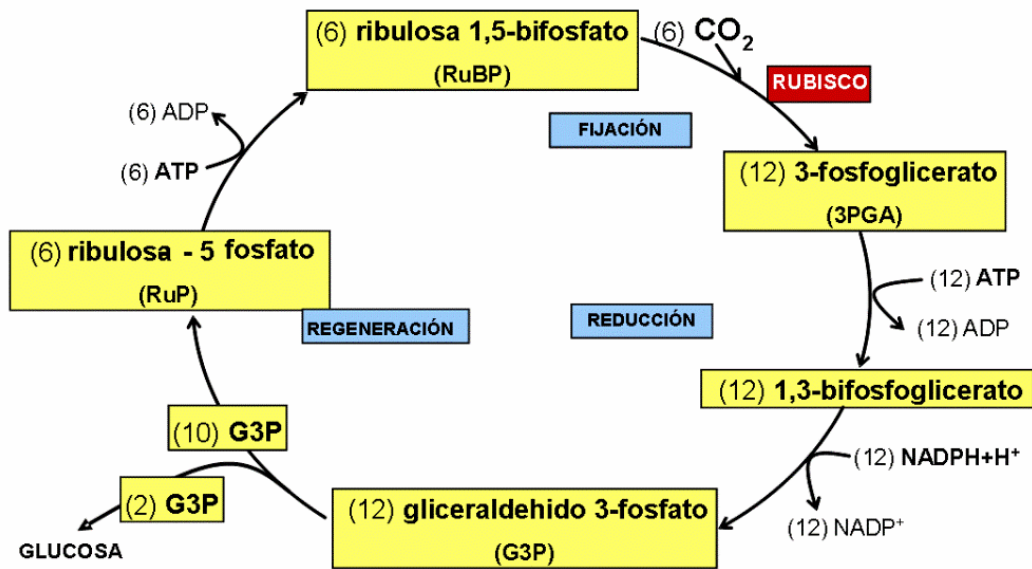


Figura 1.2.6 Esquema del ciclo de Benson-Calvin indicando en azul las tres etapas que comprende. Adaptado de Medrano & Flexas, 2000

En este ciclo se distinguen tres fases (Fig. 1.2.6), la primera fase comprende la carboxilación de la molécula aceptora del CO_2 , la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP), por la enzima Rubisco, dando lugar a dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3PGA). En las plantas que presentan esta ruta sin adaptaciones adicionales, el primer producto de la fijación son moléculas de tres carbonos y por esta razón se denominan plantas C3. Esta etapa es seguida de la fase reductiva, en la que el 3PGA será reducido a triosas fosfato (TP) -gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP) -, con consumo de ATP y NADPH. La fase final del ciclo comprende la fase regenerativa en la que por isomerizaciones, condensaciones y reordenaciones, las TP son utilizadas para producir RuBP, proceso que requiere también ATP (Raines *et al.*, 1999). Parte de las TP generadas en el ciclo de Benson-Calvin serán exportadas al citosol y servirán como fuente de carbono para la síntesis de sacarosa, que se distribuye desde tejidos *fuentes* - hojas maduras - a órganos heterotróficos o *sumideros* - raíces, semillas, hojas en desarrollo, frutos o tubérculos - y es empleada en procesos de crecimiento activo, en la biosíntesis de celulosa, lípidos... - (Fallai *et al.*, 2008). Si la demanda de asimilados cesa, se produce la acumulación de TP en el estroma, y aquí serán empleadas para la síntesis de glucosa-fosfato (Fig. 1.2.6) y posteriormente polisacáridos de almacenaje - almidón predominantemente -. El almidón comprende polímeros de glucosa que son empaquetados en el cloroplasto formando gránulos densos (Zeemann *et al.*, 2002) y representa un almacenaje transitorio de carbono, que es movilizado

Introducción

durante la noche para soportar el metabolismo de la hoja y mantener la síntesis y distribución de sacarosa (Niittyta *et al.*, 2004). Ciertos aminoácidos y lípidos son sintetizados también en el cloroplasto a partir del carbono fijado en la fotosíntesis (Geigenberger *et al.*, 2005). La actividad de varias enzimas del ciclo - entre ellas Rubisco - se regula por el sistema redox ferredoxina/tiorredoxina: Con luz, la Fd se reduce y los e^- se transfieren a la tiorredoxina (Td), formándose Td reducida. Ésta activará distintas enzimas del ciclo por reducción de sus puentes disulfuro (Malkin & Nigoyi, 2000). También la fructosa-1,6-bisfosfatasa y la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa pueden ser activadas, como la Rubisco - ver apartado siguiente -, por variaciones de pH y la concentración de magnesio (Mg^{2+}) del estroma. Igual que el anterior, éste es un mecanismo para la activación enzimática durante el día y su desactivación durante la noche.

1.2.3.1 Características de la enzima Rubisco

Esta enzima, en plantas superiores (Fig. 1.2.7), está constituida por ocho subunidades grandes (LS) de unos 50-55 kDa que forman un núcleo octamérico y ocho subunidades pequeñas (SS) de 13-18 kDa (Fig. 1.2.7) situadas alrededor del núcleo (Knight *et al.*, 1990), que al ensamblarse generan una holoenzima de estructura hexadecamérica (Fig. 1.2.7) con ocho centros activos (Irvin & Robinson, 2005; Andersson, 2008).

Además de la carboxilación, la Rubisco también es capaz de catalizar la oxigenación de RuBP, dando 3PGA y fosfoglicolato en lugar de las dos moléculas de 3PGA que se obtienen por carboxilación. Este fosfoglicolato se convierte de nuevo en 3PGA en un proceso que consume energía y O_2 a la vez que libera CO_2 , por lo que se denomina **fotorrespiración**. El balance neto en plantas con metabolismo C3 es la pérdida de más del 30 % del CO_2 fijado durante las horas de luz (Ogren, 1984), por lo que se han desarrollado estrategias para potenciar la fijación de CO_2 sobre la vía fotorrespiratoria - metabolismo C4 y CAM -. El nivel de fotorrespiración depende de la intensidad luminosa, de la capacidad de discriminación de la Rubisco entre los dos sustratos de la enzima y de las concentraciones relativas de O_2 y CO_2 en el ambiente de la enzima, que varían con factores como la temperatura - que disminuye la solubilidad del CO_2 frente al O_2 (Jordan & Ogren, 1984) - y el cierre de estomas - que reduce el CO_2 del interior de la hoja (C_i). La velocidad de asimilación neta del CO_2 (A) en plantas C3 depende del número de carboxilaciones de Rubisco menos el CO_2 perdido por fotorrespiración y respiración mitocondrial (Von Caemmerer & Quick, 2000). Cualquier incremento de la producción precisa que aumente la

fijación de carbono, ya que la biomasa de un cultivo se deriva casi por completo de su asimilación en la fotosíntesis (Paul & Foyer, 2001).

La Rubisco posee una serie de características, tales como, una lenta velocidad catalítica (Parry *et al.*, 2007), una baja afinidad por el CO₂ atmosférico y además el O₂ puede también ser sustrato - es inhibidor competitivo -, lo que sumado a la baja concentración atmosférica del CO₂ respecto al O₂, hace que la velocidad de carboxilación sea lenta. En consecuencia la Rubisco puede llegar a ser un 50 % de la proteína soluble total de una hoja en plantas C3 (Irvin & Robinson, 2005; Zhang *et al.*, 2006; Andersson, 2008) y es donde se adscribe gran parte del nitrógeno foliar (Irvin & Robinson, 2005; Hirel & Gallarais, 2006; Zhang *et al.*, 2006). Esto la convierte en la proteína más abundante de la biosfera (Ellis, 1979).

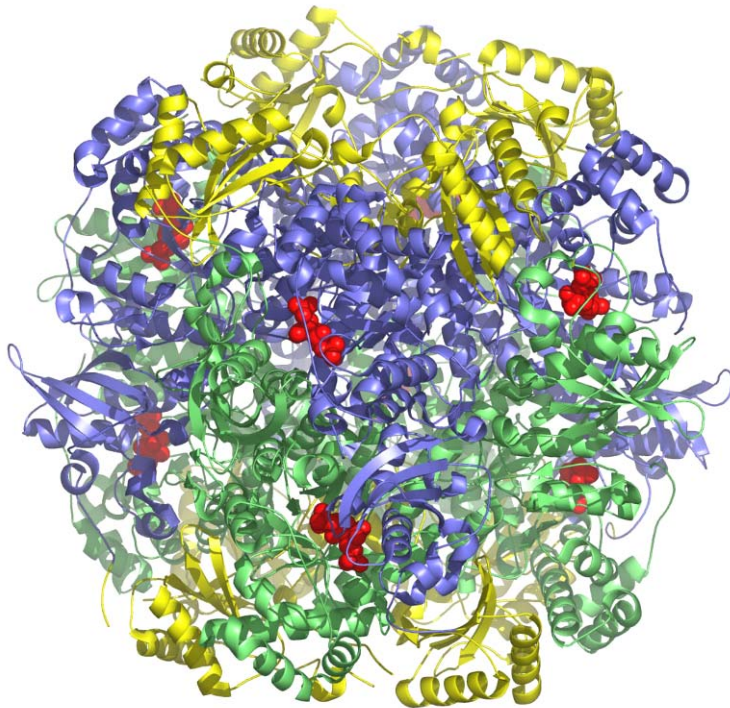


Figura 1.2.7 Estructura tridimensional de la enzima Rubisco mostrando las subunidades L (azul y verde) y las subunidades S (amarillo). A la vez se observan, colocados en los centros de reacción, los sustratos catalíticos RuBP (rojo). Anderson, 2007

Potencialmente también es una proteína de reserva de nitrógeno (Millard, 1988; Irvin & Robinson, 2005). La degradación específica de la Rubisco, movilización de sus aminoácidos y consecuente reutilización de sus elementos juegan un papel fundamental en el balance nutricional de las plantas (Ferreira *et al.*, 2000; Hirel & Gallarais, 2006). Se ha observado repetidamente que cuando los organismos fotosintéticos se enfrentan a condiciones adversas, pueden degradar parte de su contenido de Rubisco para la síntesis rápida de otros componentes esenciales para superar el estrés. Por otra parte, durante la senescencia natural de órganos verdes propia del desarrollo vegetal, los componentes de la Rubisco suponen una fracción importante del aporte que se adscribe a los órganos en crecimiento como nuevas hojas, semillas o frutos (Kokubun *et al.*, 2002; Hirel & Gallarais, 2006; Zhang *et al.*, 2006).

Para adquirir su competencia catalítica, los centros de reacción deben experimentar un proceso de **activación**, mediante la formación de un carbamato con una molécula de CO₂. Este CO₂ “activador” es diferente del CO₂ que sirve de sustrato a la reacción (Lorimer & Miziorko, 1980) y permanece unido a la enzima durante múltiples ciclos catalíticos. La activación se completa con la coordinación de un átomo de Mg²⁺ al carbamato que también es esencial para la catálisis (Lorimer & Miziorko, 1980; Von Caemmerer & Quick, 2000), para por último, colocarse el sustrato RuBP. La unión de RuBP y de otros azúcares fosfato antes de la formación del carbamato, así como inhibidores nocturnos y diurnos, puede

bloquear dichos centros activos. Para retirar inhibidores y aumentar la eficiencia de carbamilación existe otra proteína dependiente de ATP llamada *Rubisco activasa* (Salvucci *et al.*, 1985; Portis, 2003; Von Caemmerer & Quick, 2000; Andersson, 2008). Además de los inhibidores nocturnos, la actividad de Rubisco *in vivo* muestra una marcada dependencia de la presencia de luz. Por un lado, la iluminación de los cloroplastos produce el incremento de pH y el aumento de la concentración de Mg^{2+} en el estroma, lo que contribuye a la activación de Rubisco (Lorimer & Mizioro, 1980). Por otro lado, la Rubisco activasa está sometida a regulación redox ligada a los ciclos de luz/oscuridad (Mott & Woodrow, 1993) explicados en el apartado 1.2.3.

1.3. EFECTOS DEL CO₂ EN LAS PLANTAS

Los efectos de las [CO₂] elevadas en la fisiología y desarrollo de las plantas han sido objeto de muchas investigaciones, detalladas en diversas revisiones (Stitt, 1991; Drake *et al.*, 1997; Curtis *et al.*, 1998; Norby, *et al.* 1999, Stitt & Krapp, 1999; Ainsworth *et al.*, 2002; Long *et al.*, 2004; Körner, 2006). La **velocidad de asimilación de CO₂ (A)** está determinada por procesos biofísicos, dentro de los que se incluyen el transporte del CO₂ a través de la hoja y los estomas, así como por procesos bioquímicos y metabólicos, 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).

Cuando el resto de variables ambientales son idóneas, hay tres procesos metabólicos que afectan directamente a la A: Actividad Rubisco, regeneración de RuBP y metabolismo de las TP (Farquhar *et al.*, 1980; Sharkey, 1985; Taiz & Zeiger, 2002). Con concentraciones bajas de CO₂ las reacciones de regeneración de RuBP del ciclo de Calvin son más rápidas que su carboxilación por parte de Rubisco y la fotosíntesis estará limitada por la disponibilidad de CO₂ o por Rubisco (Fig. 1.3.1), dado que en este caso el CO₂ es el sustrato limitante (Long, 1991; Long *et al.*, 2004). Un incremento de la [CO₂] hace que aumente la velocidad de fijación - porque la Rubisco tiene una baja afinidad por el CO₂ - y a la vez se incrementa la proporción de CO₂ respecto al O₂, lo que estimularía la reacción de carboxilación sobre la oxigenación y disminuiría la pérdida de carbono por fotorrespiración (Long, 1991; Stitt, 1991; Stitt & Krapp, 1999; Long *et al.*, 2004), así que en las plantas C3 inicialmente la A se eleva (Fig. 1.3.1, Fig. 1.3.2), pero al seguir elevando la concentración de este gas, la velocidad de carboxilación superará a la velocidad de regeneración de la

Introducción

RuBP, que es el otro sustrato de la enzima, y la fotosíntesis, aunque sigue aumentando ligeramente por la inhibición gradual de la oxigenación, alcanzará un máximo - parte estacionaria de la curva - donde la A no aumentará más (Fig. 1.3.1). El metabolismo de las TP junto con la regeneración de RuBP - que precisa mucha de la energía química obtenida en la fase luminosa junto con el fosfato liberado en el metabolismo de las TP - se convierten en los factores limitantes cuando el CO₂ es elevado (Stitt, 1991, Azcón-Bieto, 2000).

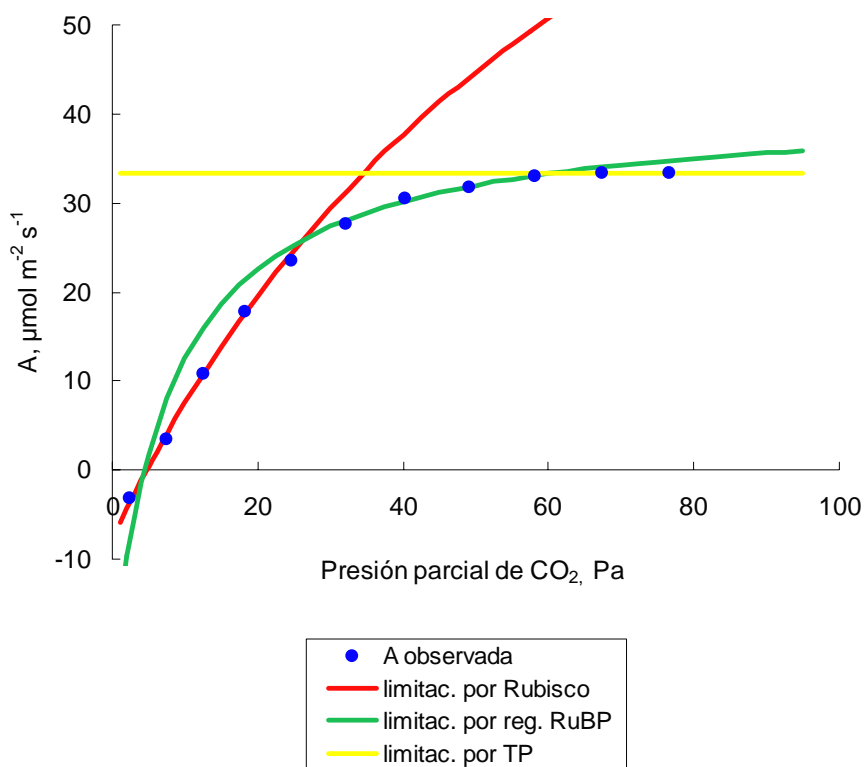


Figura 1.3.1. Curva A/Ci de respuesta de la velocidad de asimilación (A) al incremento de la presión parcial de CO₂ medida en una planta de metabolismo C₃ (●), donde se observa en la parte inicial de la curva la limitación por Rubisco (rojo), la limitación por regeneración de RuBP (verde) y por el reciclado de las TP (amarillo).

Con respecto a **la respiración mitocondrial**, se sabe que los niveles de CO₂ altos no la afectan de forma directa (Jahnke & Krewitt, 2002; González-Meler & Taneva, 2005). Indirectamente, una [CO₂] elevada aumenta los azúcares solubles y la velocidad respiratoria inicialmente se estimula, aunque a largo plazo se encuentran reducciones (Drake *et al.*, 1997; Norby *et al.*, 1999). Sin embargo, cuando estos estudios se hacen comparando plantas crecidas con CO₂ ambiental o elevado medidas a la misma [CO₂], las diferencias son mínimas (González-Meler & Taneva, 2005).

El CO₂ alto genera descensos en la proteína foliar (Drake *et al.*, 1997) y aunque muchos estudios atribuyen dicha reducción al descenso de proteínas fotosintéticas, puede haber cambios en proteínas implicadas en la respiración mitocondrial (Azcón-Bieto *et al.*, 1994),

así como incrementos en el número de mitocondrias (Griffin *et al.*, 2001); en este último estudio sin embargo, no se observó un aumento de la respiración.

1.3.1. **La aclimatación al CO₂ elevado**

Con las concentraciones actuales de CO₂, la limitación de la fotosíntesis se debe a la disponibilidad del CO₂, ya que en plantas C3 se precisan en torno a 600 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ para saturar la fotosíntesis (Long *et al.*, 2004; Lawlor, 2005). Por esta razón los incrementos de la [CO₂] en la atmósfera aumentan la fijación de carbono (Fig. 1.3.2), el crecimiento y la productividad de numerosas especies (Lawlor, 2005). Este efecto positivo, se manifiesta inicialmente en un incremento de la A y de la síntesis de más asimilados que estimulan la formación, crecimiento y supervivencia de sumideros (Fig. 1.3.2) como meristemos, raíces o frutos. Con CO₂ alto se acelera la formación de TP, y si la planta no es capaz de aumentar al mismo ritmo la síntesis de sacarosa, su exportación o acumulación como almidón, el fofato no se recicla a igual velocidad que la fijación de carbono y se acumulan dichos intermediarios fosforilados (Wolfe *et al.*, 1998; Paul & Foyer, 2001). Esto induce una aclimatación a corto plazo donde el aumento de A observado en plantas que crecen continuamente con CO₂ elevado, es menor que el incremento de la A que se observa en plantas que crecen con CO₂ ambiental al pasar a un ambiente con CO₂ alto. Aunque la planta reajustará en poco tiempo la cantidad y actividad de las distintas enzimas fotosintéticas para que asimilación y utilización del carbono se equilibren y vayan a la par (Stitt, 1991), la magnitud de este fenómeno dependerá de las condiciones ambientales que puedan retardar el crecimiento reduciendo la demanda de azúcares (Wolfe *et al.*, 1994; Pieters *et al.*, 2001) y también de la capacidad del vegetal para aumentar la demanda de asimilados o su capacidad de almacenamiento (Wolfe *et al.*, 1994,1998). Por esto las especies capaces de aumentar el tamaño de sus frutos como *Citrus sp.* o *Solanum tuberosum* tienen menor grado de aclimatación (Paul & Foyer 2001). Sin embargo, la aclimatación a corto plazo normalmente no se genera por limitaciones debidas al metabolismo de TP. La acumulación de azúcares solubles en hojas, ya sea inducida experimentalmente, debida a una interrupción del transporte por el floema o debida al crecimiento con CO₂ alto, se acompaña de incrementos de ATP y descensos de 3PGA, que es lo contrario de lo que se esperaría si la limitación por el reciclado de TP fuera la causa del descenso de la fotosíntesis (Morcuende *et al.*, 1997, 1998; Stitt & Krapp 1999)

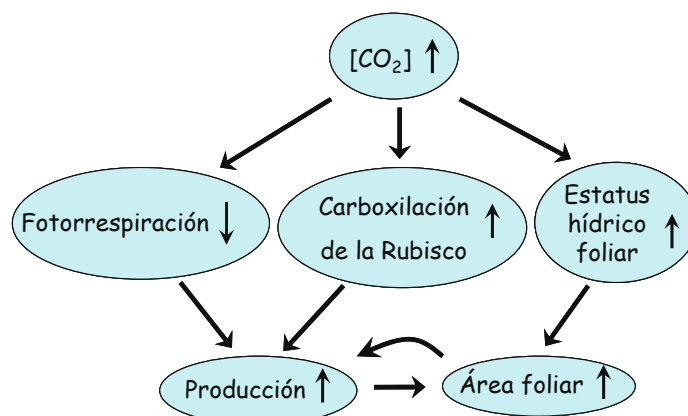


Figura 1.3.2 Esquema de los efectos iniciales del aumento de CO₂ atmosférico en plantas C₃. Las [CO₂] altas aumentan la carboxilación por la Rubisco, mientras que inhiben las reacciones de oxigenación y por lo tanto la pérdida del carbono fotorrespiratorio disminuye. El aumento de producción permite mayor desarrollo del área foliar, con la consiguiente retroalimentación positiva en la A de la planta. Esto además está reforzado por la disminución de la transpiración y la mejora en el estatus hídrico, que también favorece al aumento del área foliar. Adaptado de Long *et al.* (2004).

Cuando las plantas crecen continuamente con CO₂ elevado, tienen lugar cambios bioquímicos, fisiológicos y hasta estructurales que disminuyen la capacidad fotosintética de la hoja, así que los incrementos iniciales de la A que provocó el CO₂ alto no suelen mantenerse tan elevados cuando pasan semanas o meses (Wolfe *et al.*, 1998; Stitt & Krapp, 1999). Este fenómeno no aparece en todas las especies, condiciones o etapas del desarrollo, pero es muy común y se conoce como **aclimatación a largo plazo** de la fotosíntesis (Drake *et al.*, 1997). Los primeros acontecimientos de la aclimatación ocurren a nivel molecular en las células del mesófilo (Fig. 1.3.4), pero la respuesta final implica al vegetal entero (Wolfe *et al.*, 1998; Paul & Foyer, 2001).

1.3.2. Causas de la aclimatación a largo plazo

Las alteraciones en el intercambio gaseoso frecuentemente observadas en CO₂ elevado son indicativas de una disminución en la capacidad de carboxilación (Stitt, 1991; Drake *et al.*, 1997; Nakano *et al.*, 1997; Rogers & Humphries, 2000; Lee *et al.*, 2001), atribuida a reducciones tanto de la cantidad como de la actividad de la Rubisco (Drake *et al.*, 1997; Rogers & Humphries, 2000). En trigo, las [CO₂] elevadas condujeron a una disminución de los ARN mensajeros de Rubisco y otras tres enzimas del Ciclo de Benson-Calvin (Nie *et al.*, 1995).

Con el transcurso de los días, si la estimulación que provoca el CO₂ alto supera la capacidad de exportación y utilización de asimilados, se genera un exceso de azúcares solubles que pueden cambiar el patrón de expresión génica (Koch, 1996), y reprimir varios genes de enzimas fotosintéticas por regulación de la transcripción o de la traducción, e incluso por regulación pos-traducciona, dependiendo de las distintas especies (Yang & Sheen, 1994; Moore *et al.* 1999; Long *et al.* 2004), haciendo que disminuyan los niveles de Rubisco y/o su actividad (Krapp *et al.*, 1993; Drake *et al.*, 1997; Rogers & Humphries, 2000). Este incremento de azúcares solubles frecuentemente observada (Long *et al.* 2004), junto con una acumulación excesiva de almidón que altera la organización de los cloroplastos (Pritchard *et al.*, 1997), parecen ser los factores que desencadenan la aclimatación a largo plazo de la fotosíntesis. Al cabo de unas semanas, la aclimatación a nivel celular se traduce en modificaciones de las relaciones entre los órganos fotosintéticos - tejidos fuente - y los colectores de recursos o sumideros, así que cambia la distribución del carbono y nitrógeno dentro del vegetal (Wolfe *et al.*, 1998). También se dan modificaciones morfológicas: se incrementa el área foliar (Fig. 1.3.2), las hojas se hacen más gruesas, mayor tamaño de las células fotosintéticas (Peterson *et al.*, 1999) y en algunos casos descende el número de estomas por unidad de área foliar (Woodward, 1987; Morrison, 1998).

1.3.2.1 Implicación de la conductancia estomática (g_s) y la transpiración (E) en la aclimatación al CO₂ elevado

Los estomas son grupos de dos o más células epidérmicas especializadas que se encuentran en la parte aérea de las plantas y cuya función es regular el intercambio gaseoso (Fig. 1.3.3, Fig. 1.3.4). Constan de un ostiolo o poro rodeado de dos células - células oclusivas - capaces de variar el diámetro del poro por cambios en su presión de turgencia (Sánchez-Díaz & Aguirrolea, 2000), regulando así la velocidad del intercambio gaseoso.

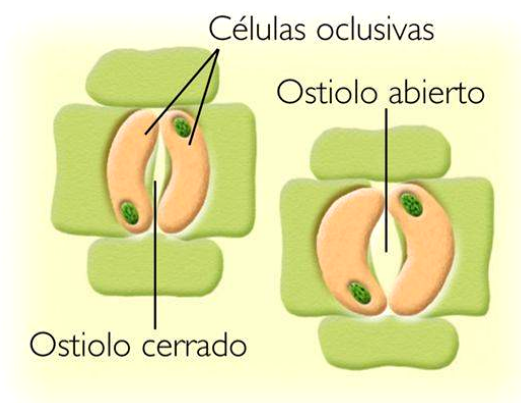
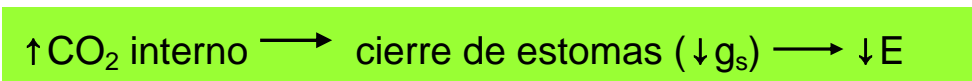


Figura 1.3.3 Esquema de un estoma donde se aprecia el cambio del diámetro del ostiolo que regula el intercambio de agua y CO₂ del vegetal.

Cuando los vegetales realizan el intercambio gaseoso, la ganancia de CO₂ se acompaña de una pérdida de agua a la atmósfera por transpiración (Fig. 1.3.4). Por lo tanto, las células oclusivas deben estar bien reguladas para evitar la deshidratación (Jones, 1998) y responden a un importante número de factores, tanto ambientales como internos de la planta, por lo que su respuesta es compleja (Morrison, 1998; Messinger *et al.*, 2006; Ainsworth, & Rogers, 2007). La **velocidad de transpiración (E)** varía en función de la intensidad luminosa, porque la evaporación de agua enfría la hoja y también en función de la disponibilidad de agua y del **CO₂ intercelular del mesófilo foliar** (Fig. 1.3.4) o **C_i** (Messinger *et al.*, 2006).

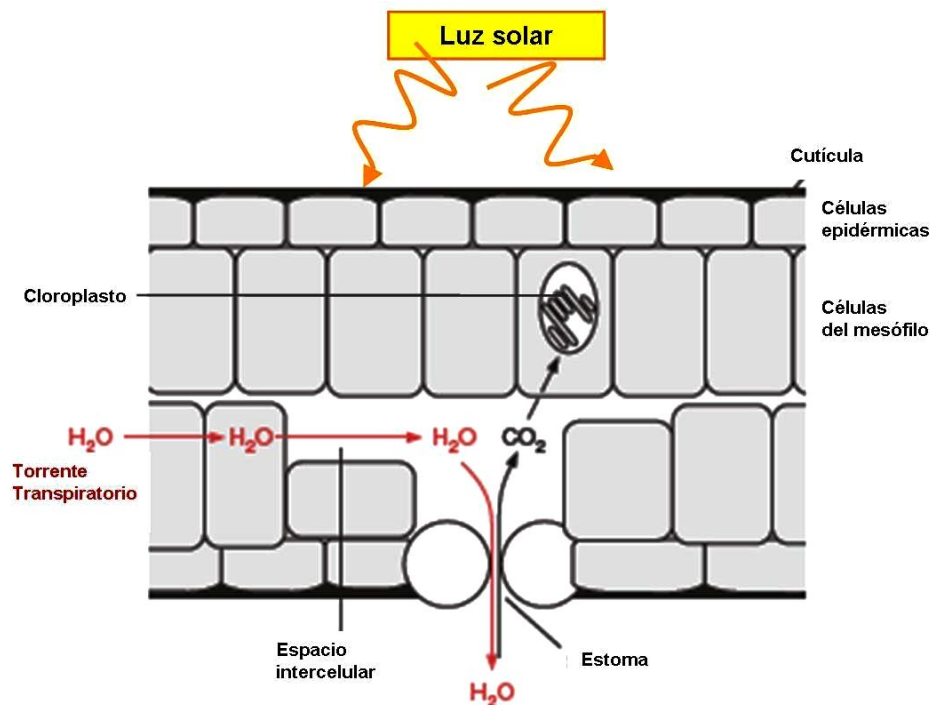
La **conductancia de los estomas (g_s)** es una medida de la capacidad de difusión de los gases a su través, que está determinada por la apertura del poro y por el número de estomas. Si por ejemplo, los niveles de CO₂ atmosférico se elevan haciendo subir el C_i, los estomas cierran el poro reduciendo su g_s y su E, pero mantendrán niveles similares o incluso mayores de C_i con los que continúan su actividad fotosintética (Schroeder, 2001; Long *et al.*, 2004). Por esta razón el CO₂ elevado mejora el estatus hídrico (Fig. 1.3.2) y la eficiencia en el uso del agua (Wolfe, 1998; Long *et al.* 2004; Leakey *et al.*, 2006).



El crecimiento prolongado en CO₂ elevado disminuye la g_s y E, ya que aumenta la concentración de C_i (Drake *et al.*, 1997; Stitt & Krapp, 1999; Tezara *et al.*, 2002), pero no ocurre por igual en todos los estratos del dosel vegetal. El crecimiento en CO₂ elevado genera fuertes reducciones de la g_s en hojas superiores (Drake *et al.*, 1997; Lodge *et al.*,

2001; Medlyn *et al.*, 2001; Tezara *et al.*, 2002) y adicionalmente al crecer y formar nuevas hojas, las inferiores con el tiempo quedan sombreadas y su producción de energía - y por tanto su A - se verá reducida. Además al aumentar la edad de la hoja disminuye la capacidad fotosintética y la E , ya que consumen menos C_i (Lemaire *et al.*, 1991; Evans, 1993; Lötscher *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2003). Los descensos de la g_s y E causan también un incremento de la temperatura foliar, esto acelera el desarrollo y la senescencia de las hojas (Long *et al.*, 2004). De forma equivocada, este efecto debido propiamente a la temperatura, a veces se ha atribuido al CO_2 elevado directamente.

Figura 1.3.4 Diagrama simplificado de la sección transversal de una hoja. Los estomas a menudo se encuentran en la cara inferior - especies como el trigo tienen estomas en las dos caras - y siempre en comunicación con los espacios aéreos intercelulares que presentan las células del mesófilo, donde se realiza



mayoritariamente la fotosíntesis. Adaptado de Heldt *et al.*, 2005.

Todas las hojas sufren aclimatación, pero en los niveles inferiores del dosel vegetal es más patente (Osborne *et al.*, 1998; Adam *et al.*, 2000). Estas hojas mostrarán a la vez aclimatación fotosintética al CO_2 alto y a la sombra, por lo que dicha aclimatación es más pronunciada en las hojas inferiores sombreadas que en las superiores iluminadas (Osborne *et al.*, 1998; Adam *et al.*, 2000). De igual modo, la respuesta de la g_s al CO_2 elevado podría variar entre hojas que ocupan diferentes niveles dentro del dosel vegetal.

1.3.2.2 Influencia del nitrógeno en la aclimatación al CO₂ elevado

Al crecer con más CO₂ la planta puede mantener velocidades fotosintéticas similares o mayores que las que presentaba con CO₂ ambiental aunque ocurra una reducción de la cantidad de Rubisco, y el nitrógeno de esta enzima podrá emplearse en formar otras proteínas para la fotoabsorción o bien dirigirse hacia el resto de órganos para estimular el crecimiento (Paul & Foyer 2001). El CO₂ elevado, a menudo, conduce a una disminución del contenido de nitrógeno en las hojas (Conroy & Hocking, 1993, Stitt & Krapp, 1999) y a una menor absorción de nitrógeno desde el suelo (Polley *et al.*, 1999) por razones que aún no han sido aclaradas. Un aumento del crecimiento en CO₂ alto no solo dependerá del carbono extra, otros nutrientes como el nitrógeno deberán también obtenerse a mayor velocidad y/u optimizar su uso. La deficiencia de nitrógeno aumenta **a)** la acumulación de azúcares solubles (Ainsworth *et al.*, 2004) incluso en CO₂ ambiental (Stitt & Krapp, 1999) y **b)** la aclimatación en la mayoría de estudios (Nakano *et al.*, 1997), mientras que con buen aporte de este nutriente no hay tanta reducción de la fotosíntesis aunque sí se acumulan carbohidratos (Ludewig *et al.*, 1998; Geiger *et al.*, 1999), indicando que su disponibilidad influye en el mantenimiento de la capacidad fotosintética y la aclimatación. La reducción de la concentración de nitrógeno podría deberse a que la absorción y la asimilación del nitrógeno no aumentan en proporción con la fotosíntesis y el crecimiento en CO₂ elevado, o también podría ser consecuencia de la dilución del nitrógeno por incrementos de la biomasa debidos al CO₂ alto (Stitt & Krapp, 1999). Puede, por lo tanto, que en la hoja no haya tal descenso del nitrógeno, sino una dilución al haber aumentado la proporción del carbono respecto al nitrógeno (Stitt & Krapp, 1999), aunque estas explicaciones pueden no ser correctas, en particular cuando los incrementos de carbohidratos o de materia seca son pequeños.

Como vimos en el apartado anterior, el CO₂ elevado disminuye el torrente transpiratorio (Fig. 1.3.4) y con ello el flujo de agua desde el suelo hacia las raíces. Esto reduce la movilidad de nutrientes solubles como el nitrato que se desplazan en el suelo por flujo de masas (Conroy & Hocking, 1993; Stitt & Krapp, 1999; McDonald *et al.*, 2002), ya que al movilizarse menos agua y existir más demanda de nitrógeno en CO₂ alto, el nitrato disponible en la rizosfera puede agotarse y producir una carencia de este elemento; aunque parece ser que ello sólo conduciría a una limitación en nitrato en suelos escasamente fertilizados (Stitt & Krapp, 1999), y que otros factores que responden al enriquecimiento en CO₂ podrían compensar un suministro de nitrógeno limitado por baja transpiración

(McDonald *et al.*, 2002). El aporte nitrogenado no sólo aumenta la cantidad de nitrógeno en el dosel vegetal, sino que también influye en la distribución del nitrógeno entre las diferentes hojas de la planta, siendo más uniforme con mayor aporte de nitrógeno (Del Pozo, 1994; Dreccer *et al.*, 2000). Por consiguiente, la nutrición nitrogenada podría mitigar la aclimatación al CO₂ elevado, en particular, en hojas inferiores sombreadas. La capacidad fotosintética, la E y el contenido de nitrógeno muestran gradientes de mayor a menor al descender posiciones del dosel en varias especies (Charles-Edwards *et al.*, 1987; Hirose *et al.*, 1989; Lemaire *et al.*, 1991; Evans, 1993; Lötscher *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2003), incluido el trigo (Del Pozo *et al.*, 1992; Dreccer *et al.*, 2000). Esto se correlaciona con la distribución vertical del nitrógeno por área (N_A) y con la luz que recibe cada estrato del dosel (Del Pozo & Dennett, 1999). La distinta E entre hojas es un mediador importante en la respuesta de las plantas al gradiente luminoso y adicionalmente, se sabe que el reparto de los recursos entre las hojas del dosel vegetal responde a la E independientemente de la intensidad luminosa (Pons *et al.* 2001).

1.3.2.3 Papel de las citoquininas (CK) en la aclimatación al CO₂ elevado

Las citoquininas (CK) son hormonas vegetales comunes en las plantas capaces de estimular la proliferación y diferenciación celular (Sakakibara, 2006), así como favorecer el retraso de la senescencia (Wingler, 1998; Jordi, 2000) retardando la pérdida de pigmentos y proteínas del cloroplasto. Las CK están implicadas en la apertura estomática (Dodd *et al.*, 2004) y pueden reducir su sensibilidad al CO₂ elevado (Blackman & Davies, 1984) a la vez que evitan el cierre de los estomas provocado por ácido abscísico (Tanaka *et al.*, 2006), además se sabe que juegan un importante papel en el desarrollo del aparato fotosintético (Chory *et al.*, 1994) y son capaces de inducir la expresión de genes de la fotosíntesis y mantener altos niveles de Rubisco (Lerbs, 1984; Ookawa *et al.*, 2004). Además participan en el crecimiento de cada órgano, actuando como mensajeros entre zonas distantes de la planta y variando la distribución de los nutrientes, modulan las relaciones fuente-sumidero (Paul & Foyer, 2001; Taiz & Zeiger, 2002), así como el balance entre parte aérea y raíz que debe mantenerse a lo largo del desarrollo (Taiz & Zeiger, 2002; Sakakibara, 2006).

Aunque las hojas jóvenes pueden sintetizarlas, su presencia en hojas maduras proviene de las CK sintetizadas en la raíz que ascienden por el xilema con el torrente transpiratorio hacia las hojas y otros órganos (Fig. 1.3.4), así que su concentración en la parte aérea depende en parte de la transpiración que presenta ese órgano (Aloni *et al.*, 2005).

Introducción

Se han encontrado reducciones del contenido de esta hormona en respuesta al gradiente luminoso que reduce la transpiración y su implicación en la aclimatación fotosintética debida al sombreado del dosel (Boonman *et al.*, 2007). La aplicación exógena a hojas sombreadas reduce el declive de la capacidad fotosintética en varias especies (Pons *et al.*, 2001; Boonman *et al.*, 2007) y se ha propuesto que estas hormonas participan en el reparto de los compuestos del xilema entre las hojas en proporción a la E (Yong, *et al.*, 2000; Pons *et al.*, 2001). En otros estudios parecen influir en la distribución del nitrógeno entre los distintos órganos (Yong *et al.*, 2000, Takey *et al.*, 2001), por lo que las CK podrían estar implicadas en la aclimatación a largo plazo de la fotosíntesis y en la pérdida de nitrógeno observada con CO₂ alto a lo largo del dosel en relación con la transpiración reducida. En efecto, si debido al descenso de E ascienden menores cantidades de estas hormonas, la síntesis proteica, el reparto del nitrógeno y por tanto la A pueden verse afectadas, a la vez que puede acelerarse la senescencia foliar, lo cual aumentaría la movilización del nitrógeno a otras partes del vegetal.

Por lo tanto, es posible que haya una relación entre transpiración, CK, y el contenido y reparto del nitrógeno en la planta, que podría explicar la aclimatación fotosintética observada en plantas crecidas con CO₂ elevado.

1.4. PROPÓSITO DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN

La humanidad basa su alimentación fundamentalmente, en los cereales y leguminosas. Es muy probable que las tierras de cultivo continúen ganando terreno al resto de ecosistemas, por un lado debido al aumento de población y también, gracias a la biotecnología, por los nuevos usos dados a los cereales en la obtención de materias primas y energía - biocombustibles -. El trigo constituye el alimento base para el 35 % de la población mundial. A nivel mundial el trigo es el cereal que mayor superficie ocupa, con 211 millones de hectáreas y una producción mundial aproximada de más de 600 millones de toneladas anuales. La producción de trigo aumentó un 1.6 por ciento desde el año 2007 (SIMIA-FAO, 2008). Es considerado un alimento para consumo humano, aunque gran parte se destina a la alimentación animal, así como a subproductos de la transformación industrial para piensos.

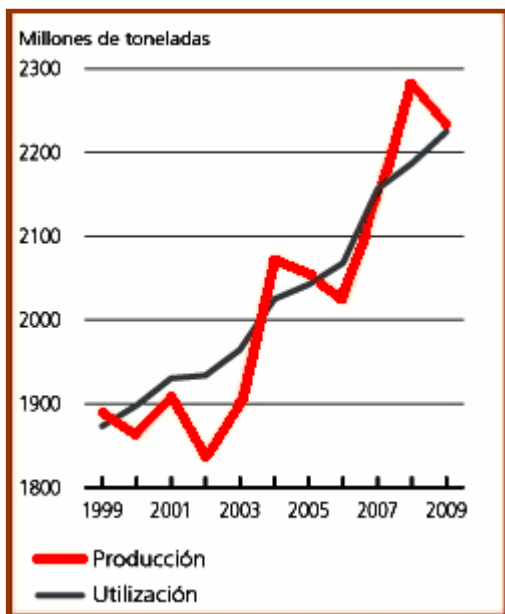


Figura 1.4.1 Producción y utilización mundial de cereales. Fuente: SIMIA-FAO (Servicio Mundial de Información y Alertas de la FAO). Perspectivas de cosechas y situación alimentaria.

<http://www.fao.org/docrep/012/ak340s/ak340s04.htm>

Los estudios sobre la aclimatación fotosintética al CO₂ alto se han centrado en las hojas superiores, sin prestar mucha atención a las situadas en posiciones inferiores del dosel, aunque existen algunas excepciones (Osborne *et al.*, 1998; Adam *et al.*, 2000).

Las plantas, en su respuesta al ambiente, deberán alterar el balance entre asimilación de carbono y otros nutrientes, especialmente nitrógeno, almacenaje de estos compuestos, y redistribución de los mismos entre órganos dentro de la planta. Por lo tanto, es importante conocer como se comportarán estos cultivos frente a los aumentos del CO₂ que se vaticinan para el próximo siglo, y estudiar sus necesidades nutricionales en estos escenarios, ya que el exceso de fertilizantes genera graves daños ecológicos.



2. Objetivos

- Conocer las respuestas de aclimatación al CO₂ elevado del intercambio gaseoso del dosel vegetal - hojas superiores iluminadas o inferiores sombreadas - del trigo en cultivos bajo cámaras de campo con cantidades diferentes de fertilizante nitrogenado.
- Averiguar el papel en la aclimatación de la absorción de nitrógeno y su reparto entre compuestos y órganos de la parte aérea de la planta.
- Valorar si la citoquinina exógena, con su acción en la transpiración y otros procesos, influye en la ganancia de nitrógeno y su distribución en la parte aérea de la planta y modifica así la aclimatación fotosintética al CO₂.



3. Materiales y métodos

3.1. MATERIAL VEGETAL DEL ESTUDIO

3.1.1. Especies utilizadas

Las distintas especies de trigo, como el resto de cereales, son monocotiledóneas de carácter anual que pertenecen a la familia de las Poáceas (Gramíneas); su origen se encuentra en Oriente Medio, en el llamado creciente fértil (Fig. 3.1.1), donde ha formado parte del desarrollo económico y cultural del hombre, que hace alrededor de ocho milenios pasó de una subsistencia nómada que dependía totalmente de la caza y recolección, a la revolución Neolítica marcada por el desarrollo de la agricultura y ganadería y el inicio del sedentarismo (Smith, 1995; Salamini *et al.*, 2002).

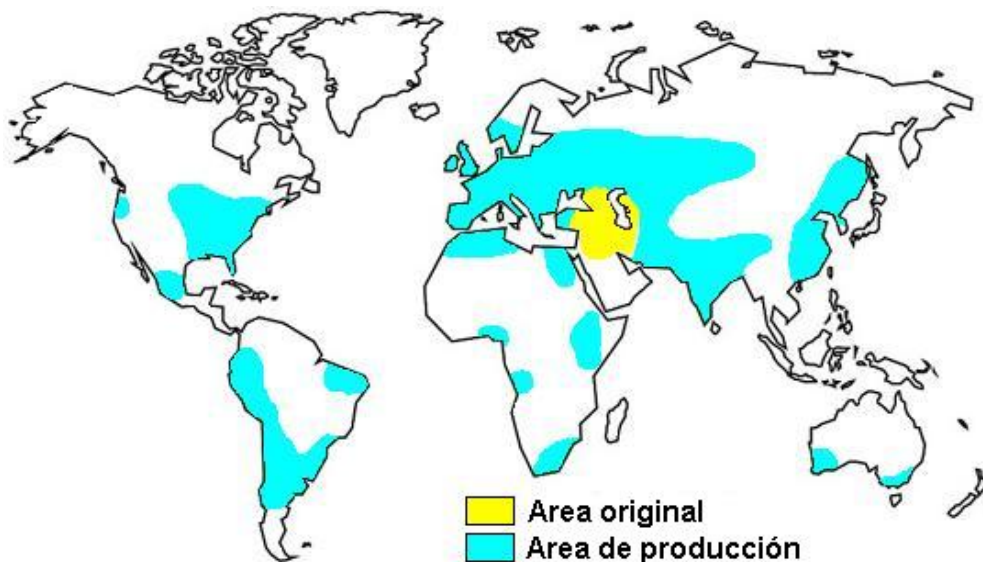
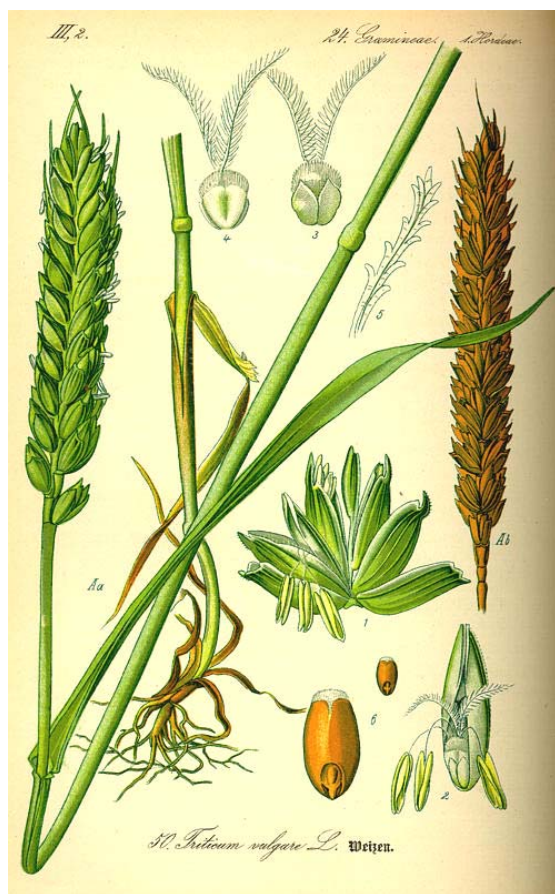


Figura 3.1.1. Región de origen y principales zonas productoras de trigo a nivel mundial. Fuente: http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Cultivo_trigo.jpg

Posee una raíz fasciculada que alcanza generalmente una profundidad de 25 cm, su tallo es hueco, con unos 6 nudos en los que se insertan las hojas, que forman una vaina a lo largo de cada entrenudo, son liguladas, cintiformes, paralelinervias y terminadas en punta. La inflorescencia es una espiga compuesta de un tallo central con entrenudos cortos, llamado raquis, al que se unen directamente y de forma alternativa a derecha e izquierda las espiguillas, protegidas a ambos lados por dos brácteas o glumas; cada espiguilla contiene varias flores con tres anteras y dos estigmas, son muy pequeñas y desprovistas de atractivo visual, ya que presenta fecundación anemófila.



Tras la fecundación, cada flor da lugar a un único fruto, la carióspside o grano, que lleva un embrión junto a las sustancias de reserva.

Existen varios tipos de variedades respecto a la duración de su ciclo: *Variedades de otoño* o de ciclo largo, con siembra en otoño, pasan el invierno en estado de plántula y crecen en la primavera, para florecer al inicio del verano; *variedades intermedias* y *variedades de primavera* o de ciclo corto, con siembra en primavera y floración en el verano del mismo año. Tienen distinta duración del período vegetativo y las variedades de invierno sólo florecen al pasar unos meses con bajas temperaturas (2 °C), mientras que esto no influye en las variedades de primavera.

Las dos especies de trigo empleadas en esta experimentación son *Triticum aestivum* L. ssp. *vulgare*, que corresponde al trigo blando, del pan o harinero, el cual se utiliza básicamente en la producción de harina para pan, galletas y repostería. La segunda especie, *Triticum turgidum* L. ssp. *durum* (Desf.) Husn (= *T. durum* Desf.), corresponde al trigo duro, semolero o candeal. Este último se destina fundamentalmente a la obtención de semolina para la fabricación de fideos y pastas.

El uso de estas distintas especies y variedades se debió a que los experimentos del presente trabajo fueron realizados a lo largo de cuatro años, enmarcados en diferentes proyectos de investigación, con distintos requisitos en cuanto a la especie de estudio.

El experimento con trigo blando del año 2003 se realizó dentro del proyecto de investigación “Interacciones del aumento del CO₂ y la temperatura del aire sobre la Fotosíntesis: cambios en el metabolismo del carbono y el nitrógeno del trigo en túneles de gradiente de temperatura en el campo” (BFI2000-0871) utilizando *Triticum aestivum* L. cv. Alcalá. Tiene una productividad baja-media, 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

rústico, resistente a la sequía, al frío y apropiado para terrenos de mediana fertilidad, en comarcas con fríos apreciables (Prats & Clement-Grandcourt, 1969).

En el experimento de 2006, que fue parte del proyecto “Aclimatación de la Fotosíntesis a los aumentos de concentración de CO₂ y temperatura de la atmósfera. Papel de la partición del nitrógeno y de los inhibidores diurnos en el control de la actividad Rubisco” (BFI2003-01277), se empleó *T. aestivum* L., cv. Gazul, un trigo blando de primavera de ciclo corto. La productividad de este cultivar es aceptable entre los trigos de primavera aunque la capacidad de ahijamiento oscila de media a baja, lo que obliga a incrementar la dosis de semilla. Tiene una altura de la planta media y el inicio del encañado es precoz; el espigado, entre precoz y muy precoz; y la madurez, de media a precoz. Su espiga aristada posee alta fertilidad y una buena calidad del grano.

El experimento de 2007 se desarrolló dentro del proyecto: “Adaptación del trigo duro a los aumentos de CO₂ y temperatura de la atmósfera. Bases fisiológicas y moleculares” (BFI2000-0871) empleando *T. durum* Desf., cv. Vitrodur. Tiene un rendimiento alto en comparación con otros trigos duros, si bien, los trigos duros en general poseen menos índice productivo que el trigo harinero. La altura de la planta es media-alta y puede superar los 70 cm, posee aristas largas y su capacidad de ahijamiento es alta; otras características son un espigado precoz y un alto contenido de proteína en el grano. Es muy apto para los climas mediterráneos secos - información obtenida de GENVCE: Grupo para la Evaluación de Nuevas Variedades de Cultivos en España -.

3.1.2. Ciclo vegetativo y requerimientos edafoclimáticos

Durante la fase vegetativa se utilizan los nutrientes minerales y carbohidratos para el desarrollo de estructuras vegetativas como raíces, tallo y hojas; por lo tanto el sumidero de los asimilados en este periodo son las partes vegetativas en desarrollo (Hirel & Gallais, 2006). Después de germinar el trigo desarrolla varias raíces primarias y el eje principal con la primera hoja emerge del suelo (Fig. 3.1.2 a). De las axilas de las hojas del eje principal nacen, en número variable, tallos secundarios que desarrollan nuevas hojas en el estadio de *ahijado del trigo*; se dice entonces que el trigo "amacolla" (Fig. 3.1.2 b). La duración de este estadio depende de la variedad, del abonado nitrogenado, de la fecha de siembra y de la temperatura. El número de tallos secundarios que la planta pueda desarrollar en esta etapa,

será un elemento determinante del rendimiento final del cultivo, ya que de cada uno que prospere surgirá una espiga.

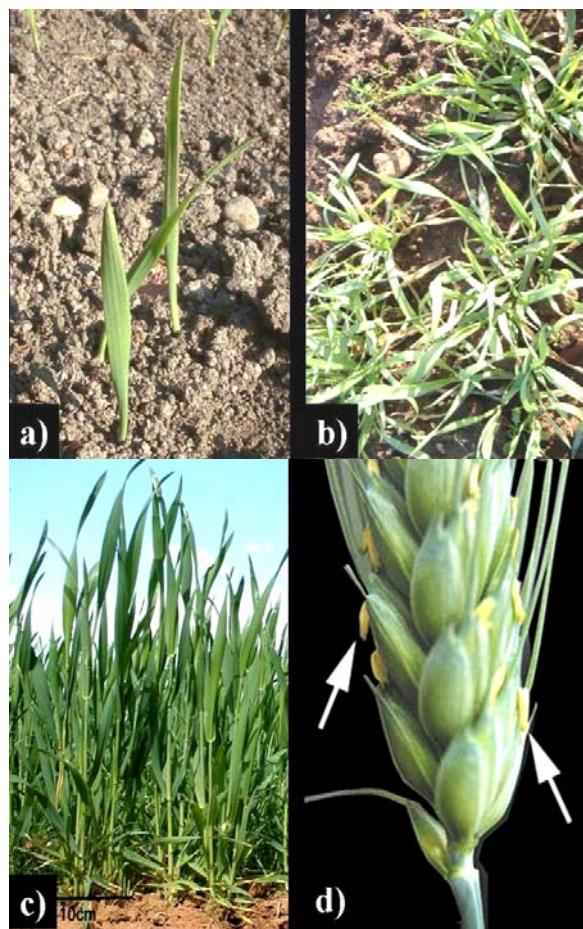


Figura 3.1.2. Diferentes estadios del desarrollo del trigo: a) emergencia del suelo, siendo visible el eje principal y la primera hoja; b) ahijado, donde ya pueden apreciarse las macollas, c) final del encañado, donde comienza a emerger la última hoja - hoja **a** o bandera - y d) plena antesis con las anteras indicadas por flechas.

A la fase de ahijado le sigue el estadio de *encañado*, consistente en el crecimiento del tallo por alargamiento de los entrenudos (Fig. 3.1.2 c). A la vez hay un cambio en la partición de los asimilados dentro de la planta, que se destinan principalmente al crecimiento del tallo, cesando en consecuencia la producción de nuevos tallos. La emergencia de la última hoja - hoja **a** o también llamada *hoja bandera* -, marca el final de este periodo (Johnson *et al.*, 2000). La planta tiene una gran actividad fisiológica que no finaliza hasta la madurez, con una tasa de extracción de elementos nutritivos del suelo muy elevada, sobre todo de nitrógeno. La extracción de agua del suelo empieza también a ser muy considerable.

En el estadio de emergencia de la espiga o *espigado*, empujada por el último entrenudo en elongación, emerge la espiga, donde como producto de la floración o antesis y la fecundación se producirán los futuros granos. Este periodo y el de crecimiento del grano son

los de máxima actividad fisiológica, con una transpiración y una extracción de nutrientes del suelo que llegan al máximo. La *antesis* es el momento de expansión completa de la flor, desde el desarrollo del estigma receptivo a la fecundación; en este momento las anteras amarillas son visibles en las espigas (Fig. 3.1.2 d). Por último durante el estadio de *llenado de grano*, los nutrientes acumulados en hojas y tallos se catabolizan para removilizarse hacia los granos en desarrollo, y así completar su maduración. El buen desarrollo de este estadio influye también en el rendimiento final del cultivo y es imprescindible que no exista estrés hídrico acusado y que las temperaturas sean suaves (Johnson *et al.*, 2000), pues si sobrevienen vientos secos y calor por encima de 30 °C durante dos días consecutivos, el grano de trigo se "asura"; este asurado se debe a la interrupción del aporte de asimilados que limita el desarrollo de la semilla y genera granos arrugados y con poco peso.

La temperatura óptima de germinación es de 20-25 °C. La temperatura de crecimiento óptima está en 25 °C, con temperaturas mínimas y máximas de 3-4 °C y 30-32 °C respectivamente (Briggle, 1980). Para un buen rendimiento se precisa una humedad relativa entre 40 y 70 % desde el espigado hasta la cosecha. En años secos un trigo puede desarrollarse bien, aunque con producción limitada, con 300 ó 400 mm de precipitación. Los suelos deben ser profundos para el buen desarrollo del sistema radicular.

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL, CONDICIONES AMBIENTALES Y MUESTREO

3.2.1. Instalaciones para el estudio del efecto del CO₂ en el cultivo

Las aproximaciones experimentales para saber cómo las plantas responderán a los altos niveles de CO₂ atmosférico, inicialmente se realizaban en invernaderos y cámaras con ambientes controlados, si bien a partir de los años ochenta se han ideado diferentes instalaciones con el fin de analizar el efecto del aumento de CO₂ en situaciones que simulen las condiciones de campo, ya sean cultivos agrícolas o ecosistemas naturales (Uprety *et al.*, 2006). Las instalaciones más frecuentes en dichos estudios son: **FACE** - Free Air CO₂ Enrichment - (Allen *et al.*, 1985), **OTC** - Open Top Chambers - (Rogers *et al.*, 1983) y **TGC** - Temperature Gradient Chambers - (Rawson *et al.*, 1995).

Los FACE o sistemas libres de enriquecimiento de CO₂, son instalaciones circulares situadas en espacios naturales - campos de cultivo, bosques, etc. - en las que por medio de tubos se emite CO₂ hacia el centro, donde se encuentran las plantas y controladores que monitorizan la dirección del viento, [CO₂] y humedad relativa (Fig. 3.2.1 a). Las principales

Materiales y Métodos

ventajas de este sistema son la alteración mínima del ecosistema en estudio y que no se modifica la interacción de la vegetación con la luz, temperatura, viento, precipitación o los agentes patógenos, por lo que las plantas se estudian en condiciones muy próximas a las naturales; sin embargo este diseño no está muy extendido a causa del difícil control y los costes elevados del CO₂ empleado (Uprety *et al.*, 2006). Otra de las desventajas consiste en la imposibilidad de analizar el efecto conjunto con otros parámetros como temperatura del aire o humedad relativa.

Los OTC o cámaras de techo abierto, se colocan sobre el terreno encerrando en su interior las plantas, a las que se suministra una concentración de CO₂ - [CO₂] -determinada (Fig. 3.2.1 b). Este sistema también mantiene las fluctuaciones térmicas, de humedad relativa y de radiación naturales, por lo que su empleo está muy extendido (Uprety *et al.*, 2006). Sus principales limitaciones serían el alto coste de instalación y funcionamiento; debido principalmente al gran consumo de CO₂, ya que debe emitirse continuamente y el del efecto barrera debido a la estructura de paredes translúcidas que rodea la instalación, la cual puede provocar cambios en la velocidad del viento, humedad o temperatura y en la calidad e intensidad de la luz (Hendrey *et al.*, 1994).



b)



Figura 3.2.1 a) Sistema FACE de la Universidad Duke, localizado en Chapel Hill, Carolina del Norte (EEUU) y b) cámaras OTC empleadas en la Universidad Szent István de Gödöllő (Hungria).

Las TGC o cámaras de gradiente de temperatura han sido el diseño empleado en la presente investigación. Son sistemas portátiles situados en el sitio de estudio, con apariencia similar a un invernadero convencional, pero con circulación del aire exterior a través de los mismos con velocidad variable (Fig. 3.2.2). Este sistema a la vez que enriquece su ambiente con CO_2 permite crear un gradiente de temperatura muy útil para estudiar las interacciones de estos factores en un ambiente natural (Hadley *et al.*, 1995). En las TGCs se puede mantener una temperatura similar a la del aire exterior o variarla para estudiar su efecto en interacción con el aumento del CO_2 , a diferencia con las OTC no climatizadas. Dependiendo del flujo de aire, el consumo de CO_2 en las TGCs puede ser menor o similar al de las OTC.



Figura 3.2.2 Vista de las TGCs en el sitio de estudio - Finca experimental Muñovela -, del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC).

3.2.2. Características de las cámaras de gradiente de temperatura (TGC)

En las TGCs (Fig. 3.2.2) gracias a un sistema de regulación electrónico se consigue la $[CO_2]$ deseada en cada TGC, así como el control de la temperatura. También permiten una monitorización continua de estos parámetros, así como de la humedad relativa y la intensidad luminosa tanto del interior como del exterior de las cámaras, como se describe a continuación.

Las TGCs (Pérez *et al.*, 2005; Aranjuelo *et al.*, 2005) están basadas en las descritas por Rawson *et al.* (1995), tienen unas dimensiones de 9.6 m de largo, 2.2 m de ancho y 1.7 m de altura en el centro, siendo el armazón de aluminio y las paredes de policarbonato rígido transparente a la radiación luminosa. El techo está cubierto por un plástico de polietileno que facilita la transmisión de la radiación solar tanto la fotosintéticamente activa como la ultravioleta UV-A y UV-B, para simular en lo posible las condiciones exteriores (Fig. 3.2.3). Después de realizar con maquinaria agrícola el labrado, abonado de fondo y la siembra, estas estructuras se anclan al suelo.

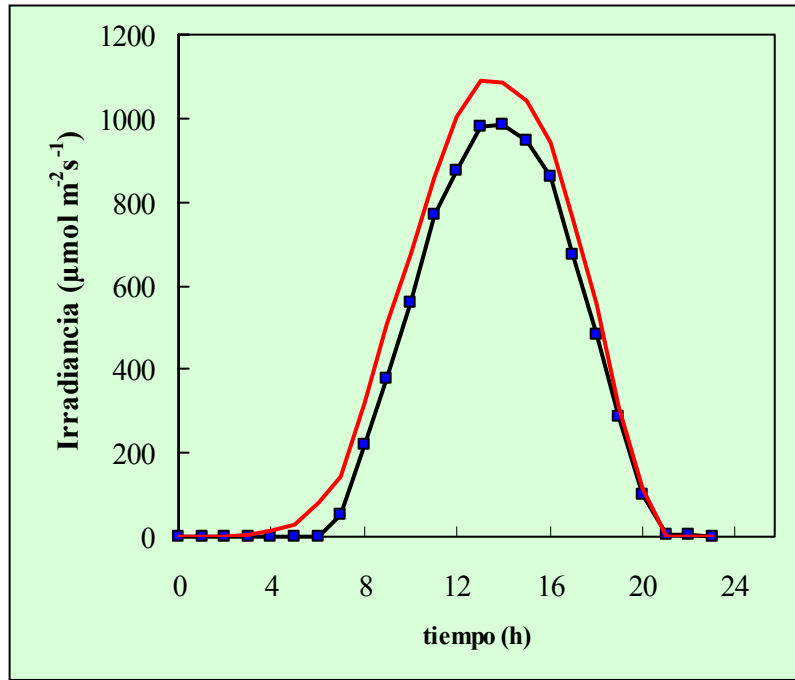


Figura 3.2.3 Valores medios de irradiancia a lo largo de un día tomados con los sensores de luz LI-190SB durante el mes de mayo de 2003 en el exterior - línea roja - y en el interior de una TGC (■).

Cada una de las cámaras está dividida transversalmente en 3 módulos (Fig. 3.2.4), cada uno de 3 m de longitud: *módulo inicial*, con temperatura ambiental, *módulo central* y *módulo final* - en el que habrá 4° C más que en el inicial -, separados por septos con ranuras horizontales para reducir el mezclado de aire por convección (Fig. 3.2.4). En el extremo final existe un compartimiento de 0.6 m en el cual se colocan tres calefactores para generar el gradiente de temperatura (Fig. 3.2.4). El extremo opuesto de la cámara tiene dos ventiladores de pared (90 W, 0.5 m³ s⁻¹) para la entrada de aire en el módulo inicial; y hay un ventilador de salida (140 W, 0.54 m³ s⁻¹) sobre el techo del compartimiento del módulo final (Fig. 3.2.4). Así el aire circula de forma continua a través de la cámara a la velocidad requerida para mantener la diferencia de 4° C entre los dos módulos extremos.

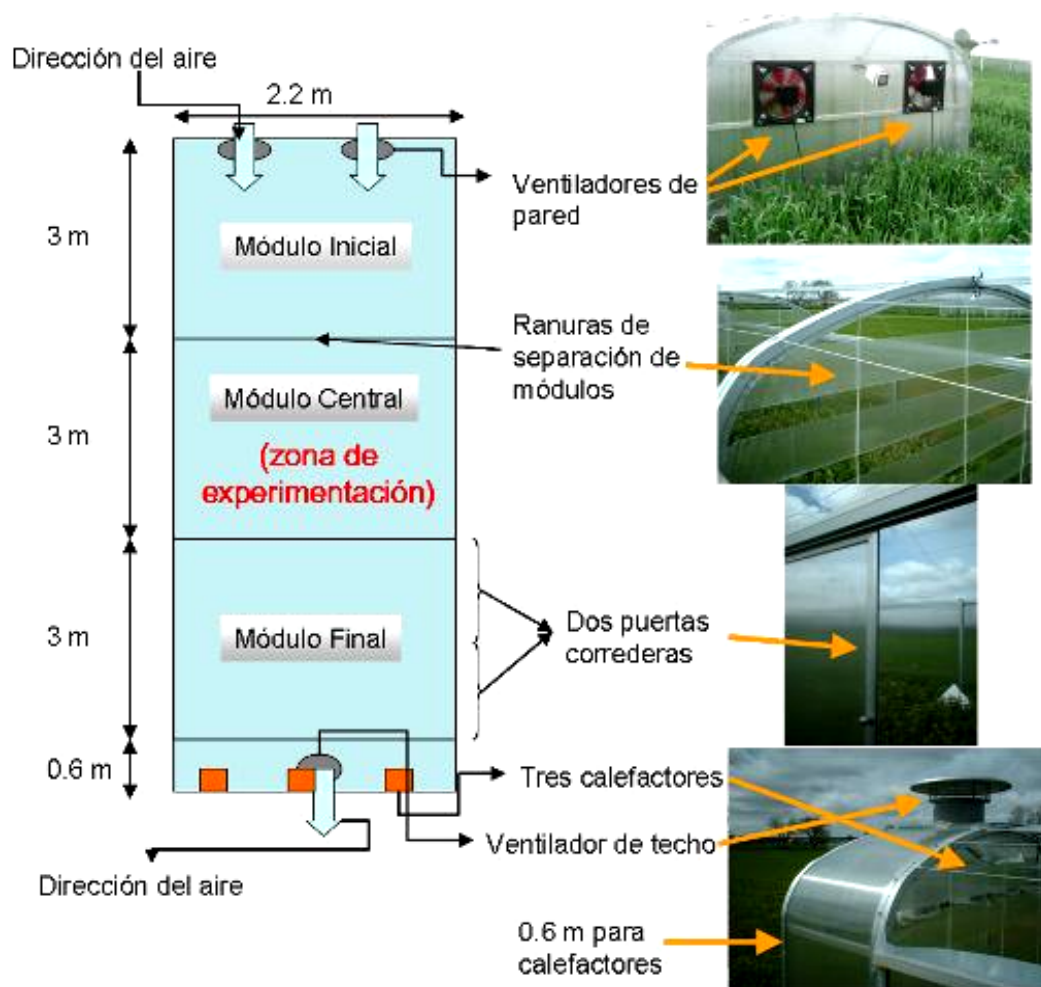


Figura 3.2.4 Esquema general de las TGCs empleadas en la presente experimentación. Véase el texto para más detalles acerca de la instalación.

El control del funcionamiento de los ventiladores y calefactores para lograr el mantenimiento de la temperatura, se realizó con dos sondas **Pt-100** (*Labfacility*, Reino Unido). Una de ellas, colocada fuera de la cámara, cercana a los ventiladores de entrada para aproximar la temperatura del módulo inicial a la temperatura del exterior (Fig. 3.2.5 a), y la otra, colocada en el centro del módulo final a 60 cm por encima del nivel de las plantas. Dichas sondas estaban incluidas completamente en una caja a través de la que se forzaba el paso de aire. En los distintos módulos de las TGCs y en la pared exterior del módulo inicial se colocaron sensores de temperatura y humedad **HMD50Y** (*Vaisala*, Finlandia) para tener una medida continua de las condiciones ambientales dentro y fuera de las TGCs. Estos sensores también estaban dentro de una caja a través de la que se forzaba el paso de aire (Fig. 3.2.5 a). El presente trabajo de investigación se ha realizado con plantas que crecían en el **módulo central**, donde hay temperaturas próximas a la ambiental en todas las TGCs (Fig.

3.2.6 b, e, h, k; Fig. 3.2.7 a, c, e); por lo tanto, dicho parámetro ambiental no fue una variable experimental en este trabajo de investigación.

La mitad de las cámaras se mantuvo con concentración ambiental de CO₂ - en torno a 370 μmol mol⁻¹ - y en la otra mitad el CO₂ del aire se aumentó hasta 700 μmol mol⁻¹ (Fig. 3.2.6 a, d, g, j) inyectando dicho gas por medio de electroválvulas (Fig. 3.2.5 b) junto a los ventiladores del módulo de entrada. El CO₂ se suministraba a partir de bombonas de CO₂ de una pureza del 99 %. Se contaba con doce bombonas repartidas en dos series situadas en una caseta cercana. Estas series de bombonas estaban controladas por un sistema informático de forma que, cuando la concentración de CO₂ descendía por debajo del nivel fijado, indicando que uno de los grupos de botellas estaba agotado, la válvula correspondiente se cerraba mientras que la del otro grupo de bombonas se abría. La [CO₂] en el interior de las TGCs se medía con analizadores de gases en el infrarrojo o IRGA **SBA-4** (*PP Systems*, Hitchin Herts, Reino Unido).

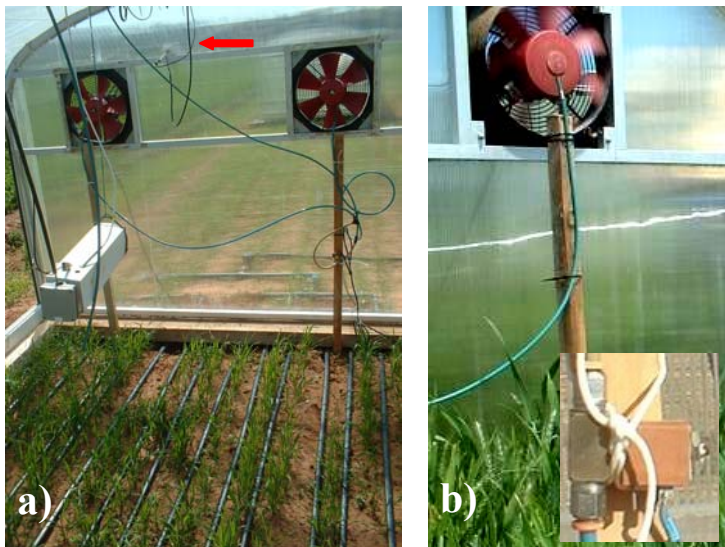


Figura 3.2.5. a) Sonda exterior Pt-100 (↑) y caja donde se incluyen los sensores de humedad y temperatura instalados dentro del módulo inicial o de entrada, con el sensor de luz interior encima y b) electroválvulas de inyección de CO₂, colocadas cerca de los ventiladores de entrada de aire dentro de las TGCs.

La intensidad luminosa se midió, tanto en el exterior como en el interior de las TGCs, para registrar la cantidad de radiación fotosintéticamente activa (PAR) y a la vez comprobar que la estructura del propio invernadero no influye significativamente en la luz que reciben las plantas ni en las oscilaciones diarias (Fig. 3.2.3). Para estas medidas se utilizaron sensores de luz **LI-190SB** (*LI-COR*, Nebraska, EEUU) localizados en el interior de las cámaras (Fig. 3.2.5 a) y en el exterior, sobre el techo de las mismas. Los registros de los parámetros ambientales (Fig. 3.2.6, 3.2.7), se realizaron cada 20 segundos a lo largo de todo el tiempo de estudio mediante convertidores analógico-digitales **Microlink 751** (*Biodata*

Ltd, Manchester, Reino Unido) con el software *Windmill* y se recopilaron para su posterior tratamiento en un ordenador situado en una caseta cerca de las TGCs.

3.2.3. Diseño y condiciones del experimento

3.2.3.1 Sitio de estudio y condiciones

Para desarrollar el estudio en condiciones próximas a las que soportan los cultivos de cereales en áreas Mediterráneas, la experimentación se ha llevado a cabo en la “finca experimental Muñovela”, del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC), localizada a 40° 95' N, 5° 45' W y 795 m de altitud sobre el nivel del mar; con cultivos de trigo sembrados en una parcela de 270 m² en 2003 y de unos 2600 m² en 2006 y 2007, según las prácticas agrícolas habituales. El sitio de estudio tiene un suelo arcillo-arenoso de pH ligeramente alcalino (pH 7.7) con niveles de fósforo, potasio y calcio de 22, 140 y 2800 ppm, respectivamente. El clima corresponde a un tipo Supramediterráneo. El promedio de un largo periodo - 20 años - para la temperatura mínima del mes más frío - enero - es 0.0 °C y la temperatura máxima del mes más cálido - julio - es 27.2 °C. La precipitación media anual es de unos 506 mm. El cultivo se regó dos veces a la semana con un sistema de goteo (Fig. 3.2.5 a) que en 2003 y 2006, para simular las condiciones propias del clima mediterráneo de la zona, proporcionaba la cantidad requerida para igualar el promedio de precipitación - de un periodo de 20 años - calculado para cada mes en particular. Al encontrar algún año de estudio síntomas de estrés hídrico, en 2007 se regó a razón de 45 L m⁻² por semana, lo que superaba ligeramente la evapotranspiración del cultivo (ET_c) a lo largo del desarrollo. Para esta estimación se ha empleado el *Método FAO Penman-Monteith de determinación de ET_c* (Allen *et al.*, 2006):

$$ET_c = ET_o \cdot Kc$$

En la fórmula, ET_o es la Evapotranspiración de referencia que dependerá de las condiciones meteorológicas y Kc es el Coeficiente del cultivo, que dependerá principalmente de las características del cultivo como son la altura, su g_s o la etapa de desarrollo en que se encuentre, y de las características de las técnicas agrícolas empleadas que influirán en la cobertura del suelo, como la densidad de siembra o el grado de separación entre hileras. Se aplicaron insecticidas y herbicidas cuando se requirió.

Se sembró el trigo con maquinaria agrícola en hileras de unos 13,6 cm de separación, dando una densidad de siembra de unos 185 a 190 kg ha⁻¹ en el año 2003 y de 200 kg ha⁻¹ en 2006 y 2007. Tras la emergencia de las plántulas, se montaron sobre el cultivo las TGCs con una separación entre las cámaras, tanto en sentido longitudinal como transversal, de unos 10 m para evitar el sombreado entre ellas. Los sitios elegidos para la instalación de las TGCs fueron distintos cada año.

El aumento de la [CO₂] se genera en las horas de luz (Fig. 3.2.6 a, d, g, j), ya que durante la noche niveles altos de CO₂ - incluso de 2000 μmol mol⁻¹ - no afectan directamente a la respiración mitocondrial (Jahnke & Krewitt, 2002) y además la toma de O₂ tampoco se afecta por [CO₂] elevadas (Amthor *et al.*, 2001).

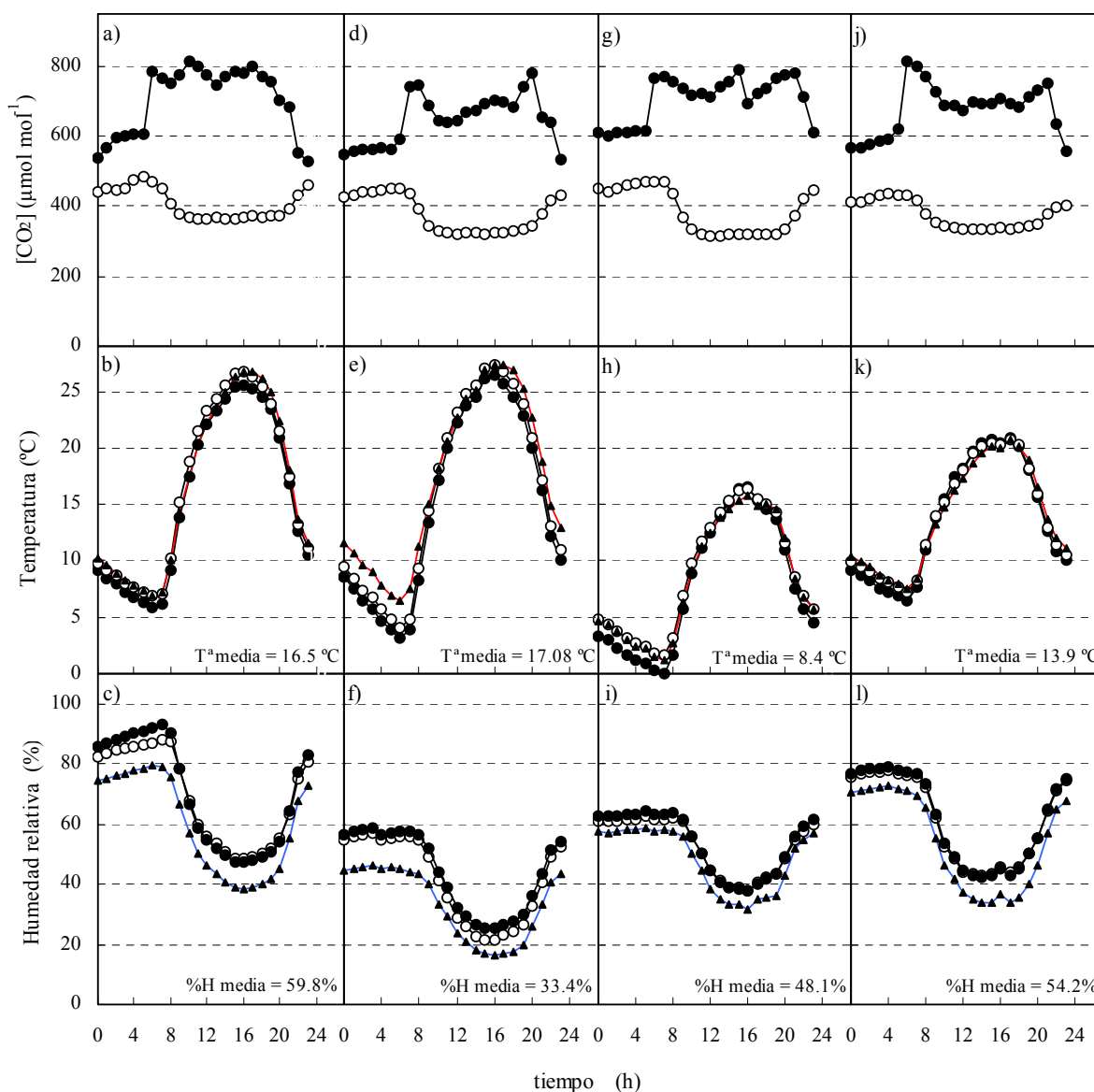


Figura 3.2.6 Variaciones diarias de la $[CO_2]$ de crecimiento (a, d, g, l), temperatura (b, e, h, k) y % de humedad relativa (c, f, i, l) registradas en el exterior de las TGCs (\blacktriangle) y en el módulo de estudio de las TGCs con CO_2 ambiental (\circ) o elevado (\bullet). a-c) Valores del mes de mayo de 2003 tomados en el exterior y en cada una de las 2 TGCs. d-f) Medias de 3 TGCs con CO_2 ambiental o elevado en mayo de 2006. g-i) Medias de 3 TGCs con CO_2 ambiental o elevado en abril de 2007 - durante la emergencia del espiga - y j-l) en mayo de 2007 - durante la antesis -. Los valores son medias de cada hora del día durante el mes de muestreo, mostrando en la parte inferior de las gráficas la temperatura y humedad relativa externa media. Para más detalles sobre el registro de los datos véase el apartado 3.2.2.

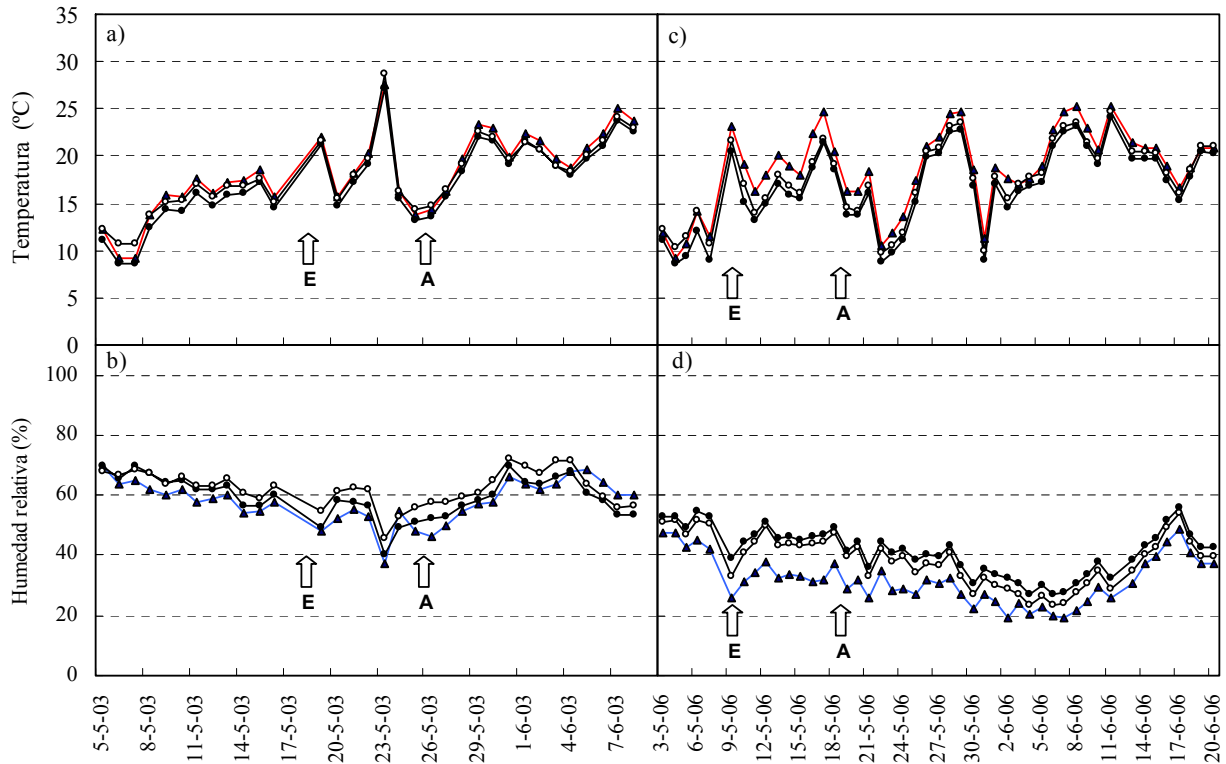


Figura 3.2.7 Valores diarios de temperatura media (a, c, e) y humedad relativa media (b, d, f) desde la emergencia de la última hoja - hoja a - hasta la madurez del cultivo registrados en el exterior de las TGCs (\blacktriangle) y en el módulo de estudio de las TGCs con CO₂ ambiental (\circ) y elevado (\bullet). a, b) Registros en 2003 tomados en el exterior y en cada una de las 2 TGCs; c, d) Valores medios en 2006 de 3 TGCs con CO₂ ambiental o elevado. e, f) Valores medios de 3 TGCs con CO₂ ambiental o elevado en 2007. Las flechas indican las etapas de emergencia de la espiga (E) y de anthesis (A). Para más detalles del registro de datos véase el apartado 3.2.2.

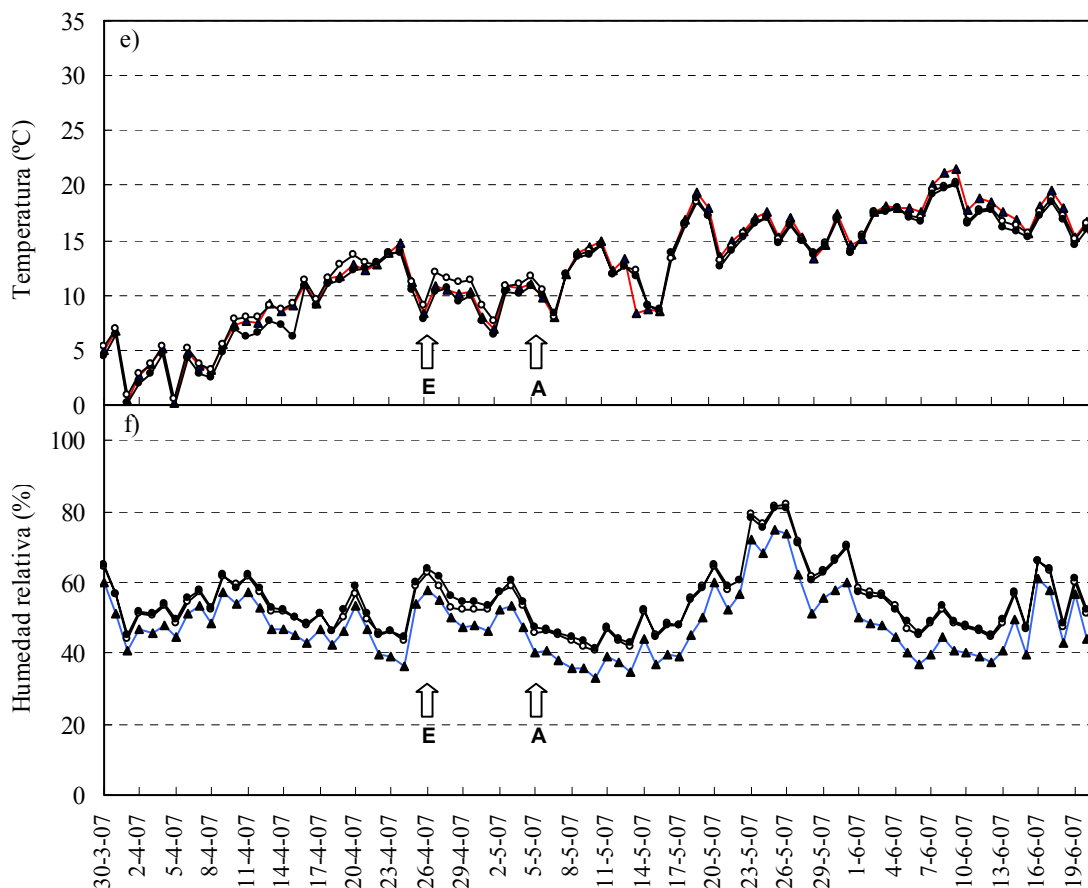


Figura 3.2.7 (Continuación)

3.2.3.2 Diseño de los experimentos

Durante los años 2003, 2006 y 2007, utilizando el módulo central de las mismas TGCs, se realizaron dos experimentos diferenciados:

1. Análisis de la aclimatación al CO₂ elevado en diferentes posiciones del dosel vegetal con dos suministros de nitrógeno (AÑO 2003)

2. Análisis del papel de las citoquininas (CK) en la aclimatación al CO₂ elevado con dos suministros de nitrógeno (AÑOS 2006 Y 2007)

1. En el año 2003 el experimento se encaminó a investigar la aclimatación al CO₂ elevado de los estomas y la fotosíntesis en el dosel vegetal, y la influencia en la misma de la absorción y reparto del nitrógeno entre los distintos órganos de la planta. En cuanto al diseño experimental se compararon plantas que crecieron en una TGC con CO₂ ambiental, o

bien con el doble de su concentración atmosférica bajo una segunda TGC; recibiendo dos aportes de nitrógeno en cada cámara (Fig. 3.2.8).



Figura 3.2.8 Fotografía de la finca experimental Muñovela con las dos TGCs empleadas en el experimento del año 2003.

Se investigaron las combinaciones factoriales de dos niveles de CO₂ de crecimiento - 370 y 700 μmol mol⁻¹ de CO₂ -, diferentes niveles foliares o estratos del dosel vegetal considerando la hoja bandera - hoja **a** -, y las tres que se encuentran en posiciones inferiores -hojas **b**, **c** y **d** - y por último se establecieron dos niveles de suministro de nitrógeno - deficiencia o abundancia en dicho nutriente - como se describe más adelante. Hubo cuatro repeticiones de las medidas y muestras pertenecientes a cada tratamiento o condición experimental y para este experimento se planteó un *diseño anidado* - véase apartado 3.4.1 -, con niveles foliares y dosis de nitrógeno incluidas dentro del tratamiento de CO₂. Los resultados obtenidos han sido publicados en la revista *Environmental and Experimental Botany* (Del Pozo *et al.*, 2007).

Para conseguir los dos aportes diferenciales en fertilizante nitrogenado, es conveniente tener un suelo deficiente en nitrógeno antes de la siembra. El año anterior al experimento - 2002 - el sitio de estudio tuvo un cultivo de alfalfa, que al ser una leguminosa es capaz de aportar nitrógeno al suelo, por ello en el invierno de 2002-03 se sembró primero un cultivo de *Brassica napus* y no se fertilizó el suelo antes de la siembra del trigo, para asegurar una diferencia en el aporte de nitrógeno en cada mitad de las TGCs. El 11 de febrero de 2003 se realizó la siembra del trigo de primavera (*Triticum aestivum* L., cv. Alcalá), que emergió del suelo el 15 de marzo, y se establecieron dos niveles de suministro de nitrógeno. En las mitades longitudinales de las TGCs elegidas al azar con abundancia de este elemento, el nitrógeno se aportó mediante la adición manual de 70 kg ha⁻¹ de nitrato cálcico tetrahidratado ((NO₃)₂Ca)·4H₂O en solución el 30 de Abril de 2003, mientras que en las zonas con déficit de nitrógeno no se añadió ninguna cantidad de dicho elemento nutritivo.

Con la colocación de las dos TGCs el 29 de abril, comenzó el suministro de CO₂. La emergencia de la espiga o espigado ocurrió del 16 al 19 de mayo de 2003, y la anthesis se produjo en torno al 27 de mayo de 2003. La madurez del grano se dio a mediados de junio, momento en el que se desconectó todo el sistema (Fig. 3.2.7 a, b).

2. El segundo experimento, que comprendió los años 2006 y 2007, se propuso analizar, basándose en las conclusiones obtenidas con la anterior investigación, cuál es el papel de la hormona vegetal citoquinina (CK) en la aclimatación al CO₂ alto en condiciones de abundancia o escasez de nitrógeno y estudiar su influencia en el crecimiento y reparto del nitrógeno, así como conocer las posibles variaciones en los contenidos de proteína soluble y de Rubisco. Las CK son reguladores del crecimiento vegetal capaces de inducir la expresión de genes de la fotosíntesis y mantener altos niveles de enzimas como la Rubisco, a la vez que están implicadas en la aclimatación fotosintética debida al sombreado del dosel y en la partición de asimilados entre órganos (Stitt & Krapp, 1999; Yong *et al.*, 2000; Pons *et al.*, 2001; Ookawa *et al.*, 2004; Boonman *et al.*, 2007).

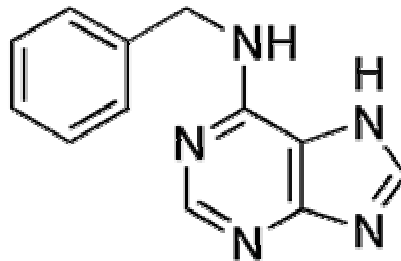
El diseño experimental fue ligeramente modificado para mejorar su bondad estadística y empleó seis TGCs, tres de las cuales se mantuvieron con la concentración ambiental de CO₂, mientras que en otras tres el CO₂ del aire se aumentó hasta 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (Fig. 3.2.9). Se adoptó un *diseño en bloques divididos* o *strip-plot* - véase apartado 3.4.1 - con tres bloques, cada uno de los cuales constaba de una TGC con CO₂ ambiental y otra con CO₂ elevado, en combinación factorial con los dos niveles de suministro de nitrógeno, la aplicación de CK frente al control, y los tres últimos estratos foliares - hojas **a**, **b** y **c** -.

En la anualidad de 2006 se sembró un trigo de primavera (*Triticum aestivum* L., cv. Gazul) el 24 de enero de 2006. Antes de sembrar se aplicó un abonado de fondo con 60 kg ha⁻¹ de P₂O₅ y K₂O - que son las cantidades normales para este cultivo - con maquinaria agrícola convencional. Después de la emergencia de las plántulas en torno al 15 de marzo, el 27 de marzo se establecieron al azar dos niveles de suministro de nitrógeno en las mitades longitudinales de las TGCs añadiendo a mano dos soluciones de nitrato cálcico tetrahidratado para aportar unas concentraciones de 15 kg ha⁻¹ en las zonas con escasez de nitrógeno y 140 kg ha⁻¹ en aquellas zonas de las TGCs con abundancia de dicho nutriente. Se colocaron sobre el cultivo las seis TGCs y el 12 de abril comenzó el suministro de CO₂.



Figura 3.2.9 Vista panorámica de la finca experimental Muñovela, donde se ubicaron las seis TGCs empleadas en los experimentos de campo con aspersión de citoquininas (CK) durante las anualidades de 2006 y 2007.

El 5 de mayo, con la hoja bandera desarrollada, comenzaron las aspersiones con CK. Basándonos en trabajos previos con arroz en cámaras de crecimiento (Ookawa *et al.*, 2004), se aplicaron al cultivo 9 L m^{-2} de dicha hormona vegetal. Para ello, se preparó cada día de uso una solución 10^{-4} M de **6-bencilaminopurina (BA)**:



La citoquinina BA - *Fluka* - primero se disolvió en 3 ml de NaOH 1 M, ya que sólo es hidrosoluble en medio básico, y se añadió Tween-20 - *Fluka* - al 0.05 % (v/v) como surfactante, para favorecer su penetración en la hoja. Se ajustó el pH a 7.5 con HCl 3 N y 0.1 N, se llevó al volumen final con agua y se almacenó una noche en nevera a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser aplicada. La solución de BA se aplicó con spray cuidadosamente a toda la parte aérea - con especial atención en los estratos foliares inferiores - en aquellas zonas de las TGCs elegidas al azar y alrededor de 4-5 h después del comienzo del fotoperiodo. En las zonas de

control se aplicó sólo una solución de Tween-20 con la misma concentración. Las aspersiones se realizaron dos veces por semana desde el comienzo de la emergencia de la última hoja hasta la senescencia del cultivo en los primeros días de junio, con un total de diez aplicaciones. La emergencia de la espiga ocurrió el 10 de mayo y la antesis entre el 16 y el 19 de mayo. La madurez del cultivo se observó en torno al 20 de junio, tomándose esta muestra o cosecha final el día 29 de junio, cuando el cultivo estaba completamente seco (Fig. 3.2.7 c, d).

Para preparar el experimento de 2007, el 6 de octubre de 2006 se sembró el trigo (*Triticum durum* Desf., cv. Vitrodur) después del arado y abonado de fondo con P_2O_5 y K_2O a razón de 60 kg ha^{-1} . Al igual que en 2003, sólo se abonaron las zonas con abundancia de nitrógeno, debido a que la parcela del cultivo tuvo alfalfa el año anterior. El 26 de febrero se aplicó a mano una solución de nitrato cálcico en las zonas con abundancia de nitrógeno elegidas al azar, a razón de 100 kg ha^{-1} .

Después de instalar las seis TGCs, el 12 de marzo comenzó el suministro de CO_2 y el 20 de marzo con la penúltima hoja en desarrollo - hoja **b** -, se inició la aplicación de CK que se repitió quince veces, de igual manera que en 2006, hasta la madurez del cultivo. La emergencia de la espiga se observó entre el 24 y el 27 de abril, la antesis media el 5 de mayo y la madurez el 25 de junio, tomándose el 4 de julio la cosecha final (Fig. 3.2.7 e, f). Este trigo duro presentó por tanto una fenología más temprana que los empleados con anterioridad. Debido a la siembra otoñal y a la suavidad de las temperaturas invernales de este año, se prolongó su desarrollo vegetativo, teniendo lugar un gran ahijamiento, pero de tallos tardíos e improductivos. Los muestreos y medidas se realizaron en los tallos de mayor tamaño y precocidad.

3.2.3.3 Toma de muestras y parámetros de crecimiento

En la anualidad de 2003, para conocer la partición del nitrógeno entre órganos, la planta se dividió en hoja **a** - hoja bandera -, hoja **b** - la situada por debajo de la hoja **a** -, hoja **c**, hoja **d** y resto de hojas - que se encontraban senescentes -; último entrenudo del tallo - tallo 1 -, resto del tallo y espiga (Fig. 3.2.10 a).

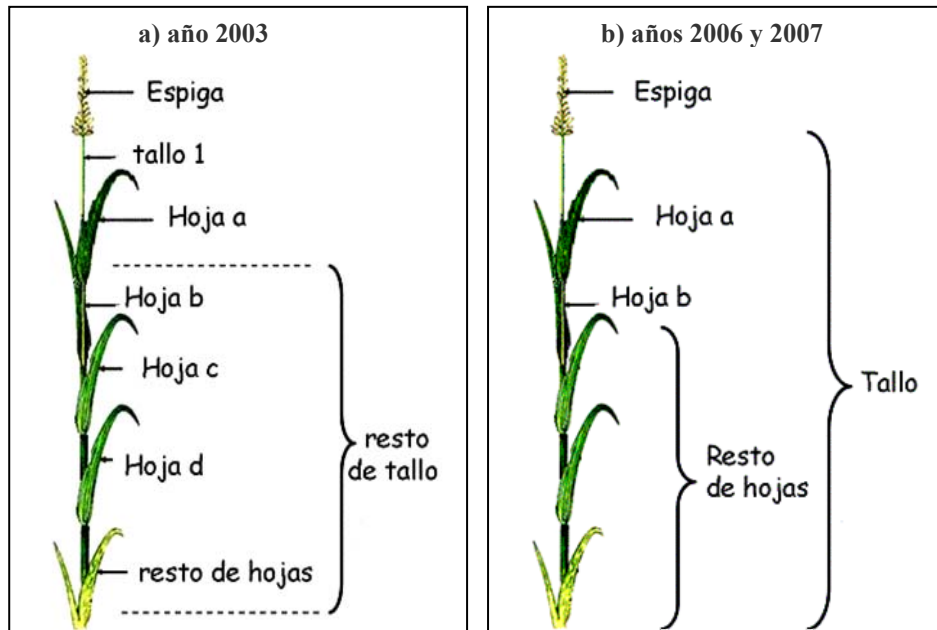


Figura 3.2.10 Representación esquemática de la parte aérea del trigo, donde se indican las partes empleadas para realizar las determinaciones de parámetros de crecimiento y los análisis del nitrógeno total; en a) el año 2003 y en b) los experimentos con aspersión de citoquininas realizados en 2006 y 2007.

En el segundo experimento, que comprendió los años 2006 y 2007, dado el mayor número de tratamientos experimentales, la planta se dividió en hojas **a** y **b** y resto de hojas; tallo y espiga (Fig. 3.2.10 b).

Se recolectaron dos tipos de muestras en función de las determinaciones a las que fueron destinadas:

a) Toma de muestras foliares para los análisis de clorofila y proteínas

Se tomaron *in situ* hojas de los diferentes estratos o niveles del dosel vegetal - pertenecientes a cada tratamiento y repetición - alrededor de 4 horas (h) después del comienzo del fotoperiodo. Estas hojas estaban completamente desarrolladas pero nunca senescentes. Las muestras se recogieron en 2003 el 28 de mayo durante la antesis. En 2006 se tomaron el 22 de mayo, tres días después de antesis - 3 dda -, y en 2007 se muestrearon el

Materiales y Métodos

18 de abril - unos diez días antes de la emergencia de la espiga - y el 16 de mayo - 10 dda -, momento en el cual la hoja c se descartó debido a su avanzada senescencia.

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 hojas de cada estrato del dosel y se almacenaron juntas. Las muestras se trasladaron desde el campo al laboratorio en nitrógeno líquido y se conservaron debidamente etiquetadas y clasificadas en congeladores a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estas muestras se utilizaron, como se describirá más adelante, para conocer la actividad y cantidad de la enzima Rubisco, y los contenidos de proteína soluble y de clorofila por peso y por área foliar.

b) Toma de muestra para medidas del crecimiento y nitrógeno total

Hubo una recolección adicional de la parte aérea, con la cual se determinó el peso fresco y seco, el área verde y el contenido porcentual de agua (%H) de los distintos órganos de la parte aérea (Fig. 3.2.10) para cada combinación de CO_2 , nitrógeno y en su caso, aspersión o no de CK. Este muestreo se empleó también para realizar la determinación del nitrógeno total por el método que se describirá más adelante. Los muestreos para el primer estudio se realizaron el 27 de mayo de 2003 en plena antesis, mientras que para seguir el desarrollo del cultivo en los experimentos con aspersión de CK, las muestras se cosecharon el 23 de mayo de 2006 - cuatro días después de la antesis - y el 29 de junio se tomó la cosecha final. En 2007 se recogieron muestras el 2 y el 24 de mayo - en antesis y a los dieciocho días después de antesis, respectivamente - y la cosecha final se tomó el 4 de julio.

Alrededor de 4 h después del comienzo del fotoperiodo, se delimitaron los dos surcos o hileras de muestreo en cada tratamiento con una regla de 50 cm paralela a dichas hileras. En las muestras pertenecientes a la emergencia de la espiga, antesis o postantesis se contaron los tallos en esos 2 x 50 cm y se cortaron a nivel del suelo cinco tallos - con espiga - consecutivos de los extremos opuestos de las dos hileras, obteniéndose diez tallos por muestra. Las muestras se transportaron rápidamente en bolsas de plástico a una habitación fría ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$) en la que se mantuvieron hasta que se procesó cada una de ellas.

Se separaron sus órganos y partes más representativas (Fig. 3.2.10) y se obtuvo con una balanza electrónica (modelo XT 220 A, *Precisa*, Dietikon, Suiza) el peso fresco de cada órgano por separado. A continuación, después de quitar las porciones foliares secas, si las había, se midió la superficie proyectada con un planímetro electrónico (modelo Li-3000 A,

LI-COR, Nebraska, EEUU). El peso seco se obtuvo después de secar las muestras en estufa a 60 °C durante 48 h. A partir de estas medidas se calcularon los pesos - fresco y seco - y área de cada órgano por tallo. La diferencia entre los pesos fresco y seco proporcionó el contenido porcentual de agua (%H) de cada parte de la planta - (peso fresco-peso seco)·100/peso fresco -. El peso por unidad de superficie foliar se calculó dividiendo el peso seco entre su área verde.

En la madurez se cosechó una muestra de mayor tamaño, integrada por todos los tallos de las dos hileras delimitadas en los 2 x 50 cm de espacio. Se pesó la muestra entera y se tomó una submuestra, en la que se contaron las espigas y se separaron éstas del resto del tallo. Se obtuvo el peso seco de cada parte después de secarla en estufa a 60 °C durante 48 h. Se separaron los granos de las espigas y se pesaron, calculándose el peso del grano y también, por diferencia, el peso de las glumas y raquis, junto con el índice de cosecha - peso grano/peso total -. Los datos de crecimiento se expresan por tallo en todos los experimentos, para dar homogeneidad a los resultados, dadas las irregularidades de la densidad del cultivo que hicieron variable el número de tallos por m² en el año 2006.

3.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.3.1. Medida de la Fotosíntesis *in vivo*

Se utilizó un *analizador de gases en el infrarrojo* - IRGA - **CIRAS-2** (*PP Systems*, Hitchin Herts, Reino Unido) con operación diferencial y circuito de aire abierto (Fig. 3.3.1) que lleva adaptada una cámara de asimilación en donde se coloca la hoja (Fig. 3.3.2). Con este aparato se pueden obtener parámetros como la asimilación neta de CO₂ o velocidad de asimilación fotosintética (A), la velocidad de transpiración (E), la concentración intercelular de CO₂ del mesófilo foliar (C_i), la conductancia estomática (g_s) - para CO₂ y H₂O - y la temperatura de la hoja. Las medidas se realizaron en 1.7 cm² de superficie de la zona central de las hojas, con un flujo de aire de 300 ml min⁻¹, una temperatura de 25 °C y un déficit de presión de vapor de 1.6 ± 0.23 kPa. La temperatura se controló con el sistema Peltier del propio analizador.

Se realizaron varios tipos de medidas de A, E y g_s de 3 a 8 h después del comienzo del fotoperiodo. Las medidas de intercambio gaseoso utilizadas para los análisis de la varianza y para las relaciones entre parámetros del experimento de 2003 se realizaron con 700 μmol

Materiales y Métodos

mol^{-1} de CO_2 y en condiciones lumínicas saturantes - con una densidad de flujo fotónico de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ -. Para el estudio de la respuesta de aclimatación de g_s y A (Bunce, 2001), así como en el estudio de la relación entre g_s y A (Ball *et al.*, 1987) de los años 2006 y 2007, se efectuaron medidas con concentraciones de 370 o $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , y $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia.



Figura 3.3.1 Imagen del analizador de gases en el infrarrojo (IRGA) portátil empleado en la presente investigación para realizar las medidas *in vivo* de la velocidad de asimilación fotosintética (A), velocidad de transpiración (E) y de la conductancia estomática (g_s).

Se tomaron medidas el 28 de mayo de 2003 - en plena antesis - en las tres últimas hojas del dosel, en 2006 hubo una medida en las hojas **a**, **b** y **c** el 22 de mayo - 3 dda -, mientras que durante 2007 fue posible realizar medidas en las hojas **a**, **b** y **c** el 17 de abril - diez días antes de la emergencia de la espiga - y el 14 de mayo a los diez días después del comienzo de la antesis - 10 dda - las medidas se tomaron de las mismas plantas y en las hojas **a** y **b**, ya que en esta fecha la hoja **c** se encontraba en senescencia avanzada.

Las medidas se realizaron, en el campo, en plantas elegidas al azar en áreas consecutivas de cada combinación de CO_2 , dosis de nitrógeno y en su caso, con aspersión o no de CK. Se midió en la parte media de las hojas del dosel perteneciente a la misma planta (Fig. 3.3.2 b), con los tratamientos dispuestos al azar, de forma que las repeticiones dentro de cada tratamiento en el estudio de 2003 o los bloques en el caso de los experimentos con CK, absorbiesen las diferencias durante el día - véase los apartados 3.2.3.2 y 3.4.1 para más explicaciones -.

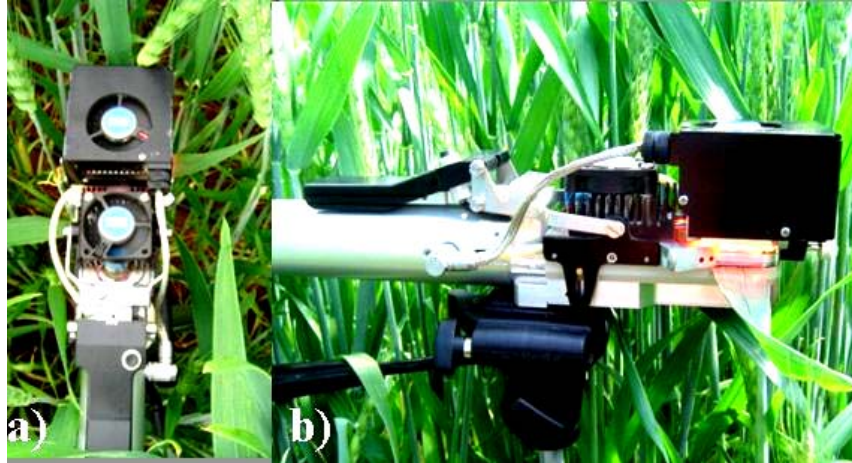


Figura 3.3.2 a) Vista frontal y b) lateral de la cámara foliar que lleva adaptada el IRGA, donde se coloca la hoja para tomar las medidas en el campo.

Las respuestas de los parámetros A ó g_s al CO_2 a largo plazo, o **efecto de aclimatación**, se cuantificaron según Bunce (2001), con el cociente entre la A ó g_s medidas a $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ en plantas que crecen con CO_2 elevado y la medida realizada a $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ en aquellas que crecieron con CO_2 ambiental. Las respuestas a corto plazo, o **efecto directo**, se calcularon con el cociente entre las medidas de A ó g_s a $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de plantas crecidas en CO_2 ambiental y la medida a $370 \mu\text{mol mol}^{-1}$ obtenida con plantas crecidas con CO_2 ambiental y el **efecto neto** se estimó como el producto de los efectos de aclimatación y directo:

$$\frac{P(e, E)}{P(a, A)} = \left[\frac{P(e, E)}{P(a, E)} \right] \cdot \left[\frac{P(a, E)}{P(a, A)} \right]$$

Donde P es el parámetro analizado - A ó g_s -, a y e denotan las condiciones de crecimiento en CO_2 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 CO_2 ambiente ($370 \mu\text{mol mol}^{-1}$) y elevado ($700 \mu\text{mol mol}^{-1}$).

La relación entre g_s y A que existió en los tres últimos niveles foliares en el experimento con adición de CK, se analizó utilizando el modelo de Ball *et al.* (1987):

$$g_s = g_0 + g_1 \frac{A \cdot H_r}{C_a}$$

Donde g_s es la conductancia de los estomas ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 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 $[\text{CO}_2]$ del aire ($\mu\text{mol mol}^{-1}$), y g_0 y g_1 son los parámetros de la regresión, que cambian cuando la sensibilidad del estoma al CO_2 se ha modificado por diferencias entre especies o si las condiciones ambientales han afectado a dicha sensibilidad (Ainsworth & Rogers, 2007). La g_s responde a numerosos estímulos ambientales (Morrison, 1998; Ainsworth & Rogers, 2007). Este modelo empírico permite cuantificar la relación de g_s con A en función de la humedad relativa y la $[\text{CO}_2]$ del aire. Las rectas de regresión obtenidas se compararon a través de un análisis de paralelismo - véase apartado 3.4.2 -.

3.3.2. Medida de la fluorescencia de la clorofila

En la anualidad de 2007 la fluorescencia de la clorofila en el dosel vegetal se midió con un *fluorímetro de pulsos de amplitud modulada PAM-2000* (Walz, Effeltrich, Alemania), en las hojas **a**, **b** y **c** el 17 de abril - diez días antes de la emergencia de la espiga - y el 14 de mayo, unos diez días después del comienzo de la antesis en las hojas **a** y **b**, ya que en este momento del desarrollo la hoja **c** se encontraba senescente. El fluorímetro consta de una unidad principal y fibra óptica (Fig. 3.3.3 b) junto con una pinza foliar (modelo 2030-B, Walz, Effeltrich, Alemania) donde se coloca la hoja (Fig. 3.3.3 a). La unidad principal está controlada por un ordenador portátil.

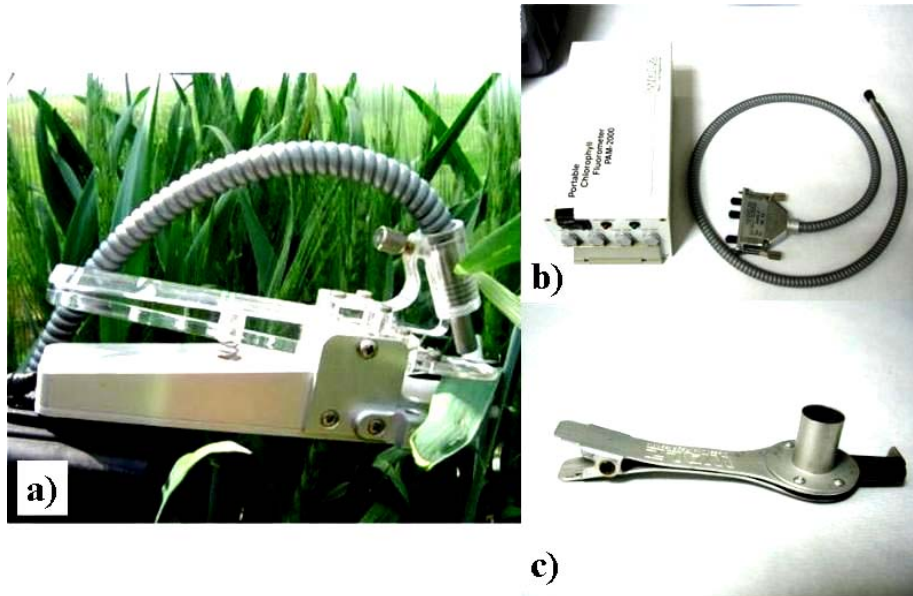


Figura 3.3.3 a) Pinza foliar 2030-B sobre la que se adapta la fibra óptica, b) fluorímetro PAM-2000 con su fibra óptica y c) pinzas usadas para la medida de la fluorescencia en el estado adaptado a la oscuridad.

Las medidas en plantas de cada combinación de CO₂, temperatura y nitrógeno se llevaron a cabo en el campo, entre 3 y 8 horas después del comienzo del fotoperiodo, utilizando la parte media de las hojas completamente desarrolladas pero nunca senescentes, apagándose las electroválvulas de inyección de CO₂ y abriendo los compartimentos de las TGCs, para realizar estos registros con CO₂ ambiental. En el caso de las medidas en el estado adaptado a la oscuridad, las hojas se oscurecieron con las pinzas suministradas por la empresa para tal efecto (Fig. 3.3.3 c) durante 20 minutos para garantizar que todos los centros de reacción del PSII estuvieran abiertos. Entonces, por medio de la fibra óptica la hoja se expuso a una luz modulada de medida muy débil y se registró la fluorescencia mínima en el estado adaptado a la oscuridad (F_o), a continuación se dio un pulso saturante de luz - de varios miles de $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - durante 0.8 segundos para determinar la fluorescencia máxima en el estado adaptado a la oscuridad (F_m). A partir de éstos, se calculó la **eficiencia fotoquímica máxima** (F_v:F_m):

$$F_v:F_m = F_m - F_o / F_m$$

Las medidas en hojas adaptadas a la luz se tomaron colocando la parte media de cada hoja del dosel en la pinza foliar, se cubrieron rápidamente con un tejido negro y se

iluminaron con la fuente de luz halógena blanca del PAM-2000 a través de su fibra óptica con irradiancias en torno a $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - similares a la luz recibida por la hoja **a** -. Se dieron pulsos saturantes cada 20 segundos hasta que se alcanzaron valores estables de los parámetros de la fluorescencia de la clorofila, registrándose tanto el valor de fluorescencia inmediatamente antes - fluorescencia en el estado estable (F_s) - como el obtenido después de cada pulso - fluorescencia máxima en iluminación (F_m') -. A continuación, se apagó la luz actínica y se encendió una luz infrarroja durante 3 segundos para reoxidar rápidamente los centros del PS II y medir la fluorescencia mínima en la luz (F_o'). El instrumento determina el **rendimiento cuántico del transporte de electrones en el fotosistema II** o Φ_{PSII} (Φ):

$$\Phi = (F_m' - F_s) / F_m'$$

También se calcularon la **extinción fotoquímica de la fluorescencia** (qP) - $(F_m' - F_s) / (F_m' - F_o')$ - y la **eficiencia fotoquímica en la luz** ($F_v' : F_m'$) - $(F_m' - F_o') / F_m'$ -. Puede notarse que la relación entre los parámetros de la fluorescencia en la luz es:

$$\Phi = F_v' : F_m' \cdot qP$$

3.3.3. Determinación de clorofila

Las muestras foliares congeladas *in situ* en nitrógeno líquido y mantenidas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ - véase apartado 3.2.3.3 a - se pesaron en una balanza electrónica (modelo XT 220A, *Precisa*, Dietikon, Suiza) - para la estimación de la clorofila en base al peso fresco -. A continuación se fotografiaron con una cámara digital, determinándose su superficie mediante análisis de imagen - para expresar los resultados en base al área foliar -, se maceraron en 4 ml de acetona al 80 % y se mantuvieron en oscuridad en el frigorífico durante 30 minutos para completar su extracción. Para determinar su contenido en clorofila se tomó una alícuota del extracto y se midió la absorbancia en espectrofotómetro (modelo 8453, *Hewlett-Packard*, Alemania; Fig.3.3.4) a 663 y 645 nm a partir de las ecuaciones de Arnon (1949):

$$\text{Clorofila total (} mg l^{-1} \text{)} = (8.02 \cdot A_{663}) + (20.29 \cdot A_{645})$$

$$\text{Clorofila } a \text{ (} mg l^{-1} \text{)} = (12.7 \cdot A_{663}) - (2.69 \cdot A_{645})$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (} mg l^{-1} \text{)} = (22.9 \cdot A_{645}) - (4.68 \cdot A_{663})$$

Tanto la clorofila total (Chl a+b) como las clorofilas a y b (Chl a y b) se expresaron en base al peso fresco foliar (mg g^{-1}) y en base al área foliar (g m^{-2}). Los valores de Chl a+b por unidad de superficie obtenidos, fueron empleados para estimar la actividad Rubisco inicial y total, así como los contenidos de proteína soluble y de Rubisco en base al área - véanse los apartados 3.3.5 y 3.3.6 -.

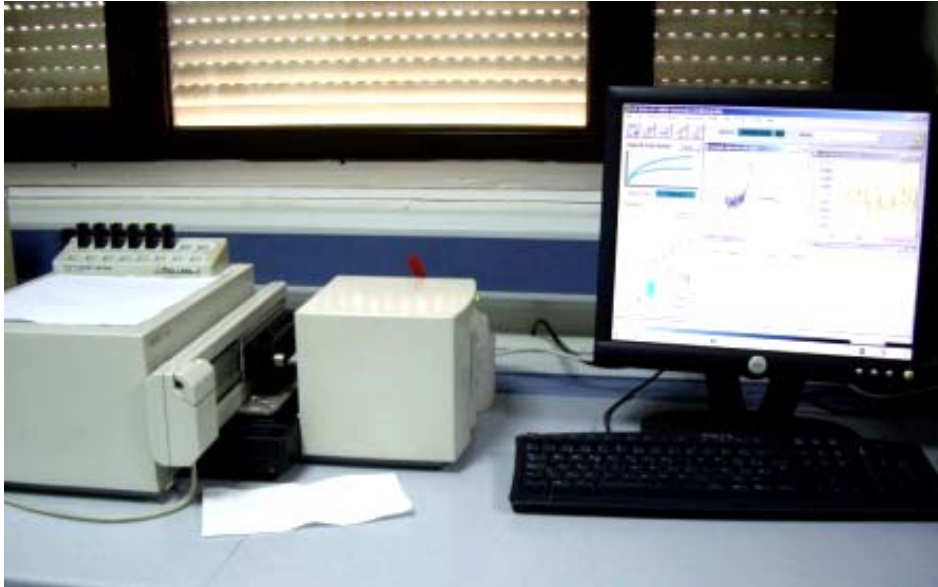


Figura 3.3.4 Espectrofotómetro Hewlett-Packard 8453 empleado en los análisis del contenido en nitrógeno y proteína soluble de los años 2006 y 2007, en los ensayos de la actividad Rubisco del año 2003 y en las determinaciones del contenido en clorofila.

3.3.4.

Determinación de nitrógeno total

Las diferentes partes de la parte aérea, después de su secado y posterior pesado - véase apartado 3.2.3.3 b - se molieron y homogeneizaron en un molino (modelo MFC, *Culatti*, Alemania). En el momento del análisis, las muestras se calentaron de nuevo, para retirar la humedad, en la estufa a 60 °C durante tres horas, se mantuvieron en un desecador hasta temperatura ambiente y se tomó una alícuota de unos 100 mg de muestra para la digestión por el método Kjeldahl. Este método se desarrolló en 1883 por Johann Kjeldahl y es ampliamente utilizado debido a su reproducibilidad y precisión (Horneck & Miller, 1998). Consiste en calentar la muestra con ácido sulfúrico (H₂SO₄), lo que genera la oxidación del nitrógeno orgánico reducido, convirtiéndose en sulfato amónico - (NH₄)₂SO₄ -, que posteriormente se disocia en medio básico dando el ión amonio - [NH₄]⁺ -, el cual ya puede cuantificarse por diversos métodos (Horneck & Miller, 1998).

El método Kjeldahl permite por tanto, estimar todas las formas del nitrógeno presentes en la planta, excepto nitratos y nitritos (Horneck & Miller, 1998):

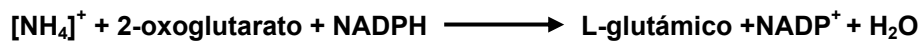


Para la digestión de las muestras se emplearon 4 ml de H₂SO₄ al 96 % (calidad PA, *Panreac*) y 0.3 g de una mezcla con selenio y sulfato de cobre (CuSO₄) como catalizadores, junto con sulfato potásico (K₂SO₄) para elevar el punto de fusión del H₂SO₄. El CuSO₄ no se usó en las digestiones del experimento de 2003 ya que interfiere por su color azul en la posterior cuantificación. En el bloque de ataque pasan en unas 3.5 h por distintas temperaturas, 1ª hora a 150 °C, 2ª hora a 250 °C y 3ª hora a 350 °C para descender hasta 200 °C, momento en el que los tubos se dejan a temperatura ambiente. Después de añadir 20 ml de agua destilada para diluir el ácido, se llevan hasta 50 ml en matraces aforados y se almacenan a 4 °C hasta su análisis.

En el presente trabajo fueron empleados dos métodos para la cuantificación, en 2003 se usó un colorímetro incorporado en el Autoanalizador de flujo continuo segmentado **AAIII** (*Bran Luebbe*, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante (Method N° 10-107-06-2-E), mientras que en los experimentos con adición de CK, la cuantificación del ión [NH₄]⁺ se llevó a cabo con un espectrofotómetro (Fig. 3.3.4) por medio de un análisis enzimático como se describirá más adelante. La elección de otro método en el experimento con adición

de CK se debió a su mayor límite de detección: el del método colorimétrico es de 0.10 mg L⁻¹ y el del método enzimático es de 0.071 mg L⁻¹ (Bergmeyer & Beutler, 1990).

El ensayo colorimétrico usado en 2003 fue el método del salicilato (Lachat Instruments; Método N° 10-107-06-2-E). El [NH₄]⁺ reacciona con el salicilato de sodio al 4% (peso/volumen) en presencia de hipoclorito sódico (NaOCl) al 5.25 % en medio básico, empleando como catalizador nitroprusiato de sodio al 1 % (p/v) y se produce azul de indofenol, con un máximo de absorción a 660 nm proporcional a la concentración de [NH₄]⁺. El análisis espectrofotométrico para estimar el contenido del [NH₄]⁺ en 2006 y 2007 se llevó a cabo por medio de un método enzimático específico (Ammonia Rapid kit, K-AMIAR 02/05) suministrado por la empresa *Megazyme* y basado en la conversión de 2-oxoglutarato y amonio en ácido L-glutámico, catalizada por la enzima Glutamato-deshidrogenasa y con gasto de un mol de NADPH por cada mol de [NH₄]⁺:



El espectrofotómetro (Fig.3.3.4) mide el descenso de la absorbancia del NADPH a 340 nm, ya que la forma oxidada NADP⁺ no absorbe en esa longitud de onda, con un coeficiente de extinción molar de 6.22 mM⁻¹cm⁻¹. Este descenso será equivalente a los moles de [NH₄]⁺, ya que la estequiometría entre oxidación de NADPH y aminación del 2-oxoglutarato es 1:1.

Para el análisis espectrofotométrico se empleó una alícuota de 500 µl. La alícuota debe diluirse hasta tener de 0.2 a 7 µg de [NH₄]⁺ en la cubeta, para que el análisis se comporte de forma lineal según la Ley de Beer-Lambert (Bergmeyer & Beutler, 1990), y también elevar ligeramente su pH hasta 3-4, para que la reacción enzimática no sea muy lenta. Para ello se empleó un tampón de tri-etanolamina 1M con pH 7.2 y una solución de KOH 5 M, usando volúmenes variables de cada solución y ajustando el volumen final, debido a la diferente acidez de las muestras. Antes del ensayo en cubeta se centrifugaron a 12000 g durante 2 minutos.

Con esta medida se calculó el porcentaje de nitrógeno en la materia seca (%N) y con el peso seco junto con el área foliar determinados previamente - véase apartado 3.2.3.3 b - fueron estimados los **contenidos de nitrógeno** de cada órgano (Nt) - mg de N · órgano⁻¹ - y el **nitrógeno por superficie foliar** (N_A) - expresado en g m⁻² - respectivamente. La adscripción del nitrógeno total de la parte aérea que hubo a cada órgano o **distribución**

porcentual del nitrógeno entre órganos (Nd) fue calculada como el porcentaje del nitrógeno total que tuvo cada órgano.

3.3.5. Análisis de la actividad Rubisco

Para el ensayo *in vitro* de la actividad Rubisco (E.C. 4.1.1.39) en el experimento de campo de 2003, se empleó el método descrito por Ward y Keys (1989) y modificado por Sharkey *et al.* (1991). En este análisis espectrofotométrico se realiza una cascada de reacciones en las que participa Rubisco (Fig. 3.3.5), una de las cuales se acopla a la oxidación de NADH por medio de Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (E.C. 1.2.1.12). El NADH posee un máximo de absorbancia a 340 nm que la forma oxidada NAD⁺ no tiene, cuantificándose el descenso de NADH mediante la disminución de la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm en un espectrofotómetro (Fig.3.3.4), con un coeficiente de extinción molar de 6.22 mM⁻¹ cm⁻¹.

La reacción catalizada por la Fosfoglicerato kinasa (PGK, E.C. 2.7.2.3) 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 (E.C. 2.7.3.2). La reacción es lineal durante 30-60 segundos y la pendiente de esta línea es proporcional a la actividad de la enzima, teniendo en cuenta que la estequiometría entre oxidación de NADH y carboxilación del sustrato de Rubisco (RuBP) es 2:1 (Fig. 3.3.5).

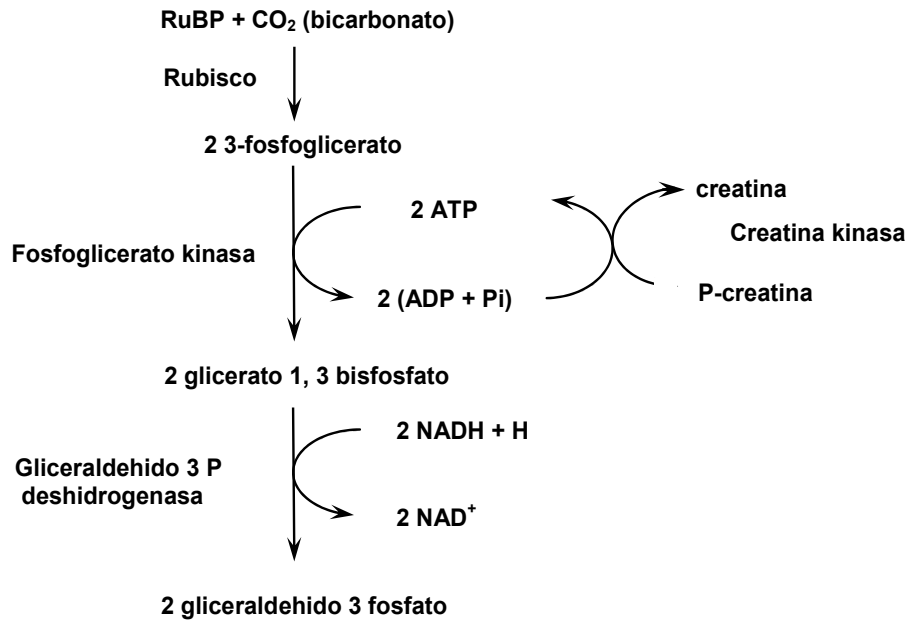


Figura 3.3.5. Esquema de la cascada de reacciones mediante la cual se realizó el análisis *in vitro* de actividad Rubisco inicial y total.

Con las muestras foliares congeladas *in situ* y mantenidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ - véase apartado 3.2.3.3 a - se realizó una extracción en mortero congelado con una solución tamponada que contiene sustancias protectoras de las proteínas:

Tampón de extracción

- Bicina-NaOH 100 mM (pH 7.8) *Sigma-Aldrich*
- MgCl₂ 10 mM *Sigma-Aldrich*
- β -Mercaptoetanol (β me) 10 mM *Merk*
- PVPP 2 % (p/v) *Sigma-Aldrich*
- Seroalbúmina bovina (BSA) 0,2 mg/ml *Sigma-Aldrich*
- Triton X-100 0.1 % (p/v) *Merk*

Para poder expresar la actividad Rubisco por unidad de superficie foliar, de una alícuota de cada muestra y repetición se determinó el contenido en clorofila en extracto de acetona al 80 % - véase apartado 3.3.3 -. El resto del extracto se centrifugó a 13000 G durante 30 segundos y con una alícuota (20 μ l) de dicho extracto centrifugado, se realizó una medida de actividad Rubisco inicial (ARI) a temperatura ambiente. El tiempo total desde la extracción hasta la medida de la ARI fue de menos de 2.5 minutos. Para realizar este

Materiales y Métodos

análisis, se añadió un cóctel que contenía todos los compuestos necesarios para llevar a cabo la reacción en cadena con la que medir la actividad:

Cóctel de Análisis:

- Bicina-NaOH 100 mM (pH 8.2)
- MgCl₂ 20 mM
- KCl 10 mM *Sigma-Aldrich*
- ATP 5 mM *Roche*
- NaHCO₃ 30 mM *Sigma-Aldrich*
- Fosfocreatina 500 mM *Sigma-Aldrich*
- Creatina kinasa 52 unidades/ml (u/ml) *Roche*
- Fosfoglicerato kinasa (PGK) 12 u/ml *Sigma-Aldrich*
- Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (GAPD) 11 u/ml *Sigma-Aldrich*
- NADH 0,2mM *Sigma-Aldrich*
- RuBP 1mM *Sigma-Aldrich*

Las enzimas comerciales suspendidas en sulfato amónico se precipitaron por centrifugación y se disolvieron en glicerol al 20 % (Sharkey *et al.*, 1991). El resto del extracto vegetal se conservó en hielo para realizar las medidas de actividad total.

Previo a la determinación de la actividad Rubisco total (ART) se realizó la incubación del extracto foliar con Magnesio (Mg⁺²) y bicarbonato (NaHCO₃) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Cóctel de activación:

- Bicina-NaOH 100 mM (pH 8.2)
- MgCl₂ 20 mM
- NaHCO₃ 10 mM
- BSA 0,2 mg/ml

- Triton X-100 0.1 %

Tras este tiempo de incubación, en el que se consigue carbamilar todos los sitios activos de la enzima, se añadió el cóctel de análisis. Tanto la actividad inicial como la total, se expresaron en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - véase apartado 3.3.3 -.

3.3.6. Determinación de proteína soluble y de Rubisco

Una alícuota de 0.1 g de las hojas tomadas en los tres últimos estratos foliares - hojas **a**, **b** y **c** -, congeladas *in situ* y mantenidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ - véase apartado 3.2.3.3 a -, se molió en mortero congelado con nitrógeno líquido añadiendo una solución tamponada de extracción con inhibidores de la actividad proteasa y agentes reductores:

- Tricina 50 mM (pH 8) *Sigma-Aldrich*
- EDTA 2 mM *Sigma-Aldrich*
- NaCl 10 mM *Merk*
- MgCl_2 5 mM
- Sacarosa 75 mM *Sigma-Aldrich*
- Ácido ϵ -aminocaproico 5 mM *Sigma-Aldrich*
- β me 8 mM
- Benzamidina 2 mM *Merk*
- Fluoruro de fenil-metano sulfonil (PMSF) 1mM *Fluka*

Los extractos se mantuvieron en hielo hasta su centrifugación 30 minutos a 12500 G y 4°C . En el sobrenadante se analizó la concentración de proteína soluble por espectrofotometría (Bradford, 1976). Para esta cuantificación, se realizó una curva patrón con disoluciones de 5 a 60 μg de BSA en 200 μl de tampón de extracción a las que se añadieron 5 ml del *reactivo de Bradford*, compuesto por:

Azul de Coomassie G-250 0.117 mM *Serva*

Etanol 4.7 % v/v *Panreac*

Ácido ortofosfórico (H_3PO_4) 8.5 % v/v *Panreac*

Materiales y Métodos

Se midió la absorbancia de cada patrón en el espectrofotómetro (Fig.3.3.4) a 595 nm. Seguidamente se prepararon disoluciones de las muestras tomando un volumen de extracto - 15 a 18 μl - y añadiendo tampón de extracción hasta un volumen de 200 μl , a continuación se añadieron 5 ml del reactivo Bradford y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 595 nm. Las proteínas se cuantificaron mediante la curva obtenida con los patrones. Los resultados se expresaron en mg g^{-1} de peso fresco y en g m^{-2} .

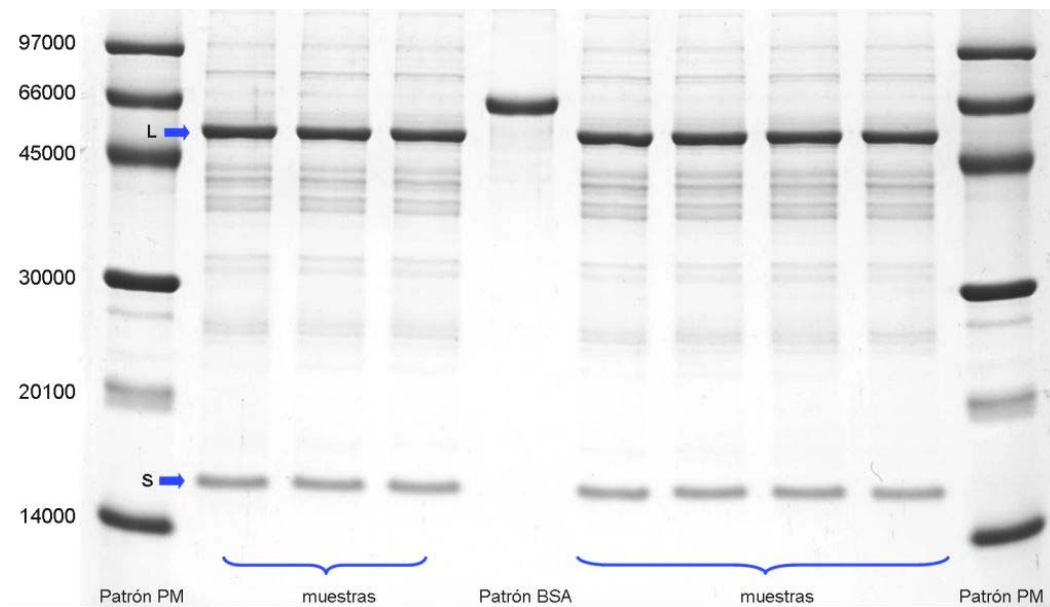
Para realizar la cuantificación de Rubisco por electroforesis SDS-PAGE (Laemmli, 1970), con los resultados obtenidos de la cuantificación por el método Bradford, se tomó de cada muestra el volumen de extracto que contenía 200 μg de proteína soluble y se mezcló con 5 volúmenes de acetona 100 % fría para precipitar la proteína. Después de pasar una noche en el congelador a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ se centrifugaron a 11500 G durante 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se retiró cuidadosamente la acetona, dejando que ésta se evaporase completamente a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió con 100 μl del buffer de carga o de muestra, que contenía:

- Tris-HCl (pH 6.8) 65 mM *Sigma-Aldrich*
- Sacarosa 3 M
- Dodecil-sulfato de sodio (SDS) 5 % p/v *Merk*
- βme 0.3 M
- azul de bromo-fenol 0.01 % (p/v) *Sigma-Aldrich*

La movilidad de las proteínas en geles de poliacrilamida dependerá de su tamaño, de su masa molecular y de su carga. En la electroforesis SDS-PAGE las proteínas se desnaturalizan y se aporta a todos los péptidos una carga negativa similar, gracias a la unión del detergente SDS a lo largo de la cadena polipeptídica., por lo que la posterior separación en el gel al aplicar la corriente eléctrica, dependerá del peso y tamaño molecular (Laemmli, 1970). El βme se emplea para reducir o mantener reducidos los puentes disulfuro de las proteínas. La alta concentración de sacarosa se usa para incrementar su densidad y permitir que el líquido se coloque en la parte inferior de la correspondiente celdilla del gel y por último el azul de bromo fenol es un colorante que sirve de indicador del avance del frente durante el proceso electroforético. Se emplearon geles de 0.75 mm de grosor y un sistema discontinuo (Laemmli & Lavre, 1973) con un *gel concentrador* al 4 % de acrilamida y Tris-

HCl 0,5 M (pH 6.8) en la parte superior y un segundo *gel separador* de 12.5 % de acrilamida y Tris-HCl 3 M (pH 8.8), usando el equipo **Mini-Protean 3 Cell** - *Bio Rad* - según las instrucciones del fabricante. Las muestras resuspendidas en el buffer muestra se calentaron a 96 °C 5 minutos y se cargaron 3 µl de muestra en cada celdilla. En las celdillas de los extremos (Fig. 3.3.6) fueron cargados 3 µl de patrones de tamaño molecular (Calibration Kit LMW for SDS electrophoresis, *GE healthcare*) y en una celda central (Fig. 3.3.6) se cargaron 3 µl de un patrón de BSA (Protein micro-standard, *Sigma-Aldrich*) preparado de igual manera que las muestras, el cual se empleó para la cuantificación de la Rubisco.

Figura 3.3.6 Imagen obtenida después de escanear un gel de poliacrilamida, donde se indican los carriles pertenecientes a los patrones de tamaño (PM), el patrón de concentración (BSA) y las muestras. Las flechas señalan la situación de los péptidos pertenecientes a las subunidades grande (L) y pequeña (S) de Rubisco, con unos pesos moleculares medios de 54 y 16 kDa, respectivamente.



La cantidad de proteína por celda fue de 15 μg para que estuviera dentro del rango de respuesta lineal a la densidad óptica de la concentración del patrón de BSA, de acuerdo con calibraciones previas. Las condiciones de la electroforesis fueron 200 V a temperatura ambiente y el proceso se completó en unos 50-55 minutos.

Los geles se fijaron en agitación durante 75 minutos en una solución de agua-metanol-ácido acético 500:150:75 (v/v/v) y se tiñeron dos horas con azul de coomassie (EZ Blue Gel Staining, *Sigma-Aldrich*). Posteriormente, el exceso de colorante se lavó con agua destilada y estos geles se escanearon usando un **Scanjet G4050** de alta resolución (*Hewlett Packard*, España) para realizar la cuantificación de las subunidades grande (LS) y pequeña (SS) (Fig. 3.3.6) de la enzima Rubisco, empleando el software de análisis de imagen *Image Quant* (Molecular Dynamics, *GE Healthcare*, España).

Para comprobar la eficiencia del análisis, los nmoles obtenidos para la LS se dividieron entre los de SS, ya que la relación mol a mol debe ser próxima a 1. Se encontraron relaciones muy variables en algunas muestras pertenecientes a los estratos foliares inferiores o a estadios avanzados del desarrollo, debido a que durante la senescencia o bajo diferentes estreses ambientales la Rubisco sufre una rápida degradación (Feller, 1986; Ferreira & Teixeira, 1992; Ferreira *et al.*, 2000; Hirel & Gallais, 2006) y normalmente en trigo (Zhang *et al.*, 2006) y la mayoría de especies estudiadas (Gutteridge *et al.*, 1986; Marín-Navarro & Moreno, 2003), su degradación por proteasas ocurre en regiones concretas de la LS susceptibles a la hidrólisis, apareciendo fragmentos de LS con diferentes pesos moleculares en función de los tratamientos (Roulin & Feller, 1998; Kokubun *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006). Por estas razones los contenidos de Rubisco en base al peso fresco (Rbco/p) y en base al área (Rbco/A) - expresados como nmol g^{-1} y $\mu\text{mol m}^{-2}$ respectivamente -, así como el % de Rubisco en proteína soluble (%Rubisco), se calcularon usando los resultados obtenidos para la SS, que es la que sufre una degradación más tardía.

3.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

3.4.1. Análisis de la varianza

La comparación de los datos experimentales obtenidos para cada anualidad y estadio de desarrollo se llevó a cabo mediante análisis de la varianza (ANOVA), analizando los efectos de los tratamientos y sus interacciones con la diferencia mínima significativa de las medias (*lsd*), considerando significativa una probabilidad <0.07 para evitar un error Tipo I.

El año 2003 el experimento empleó dos TGCs y tuvo un **diseño anidado** con combinaciones factoriales de dos niveles de CO₂ de crecimiento - 370 y 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ -, dos niveles de suministro de nitrógeno - deficiencia o abundancia en dicho nutriente - y los diferentes órganos y estratos del dosel vegetal - hojas **a**, **b**, **c** y **d** -, tomando cuatro repeticiones de las medidas y muestras de cada tratamiento. El análisis de la varianza de los resultados de este experimento se llevo a cabo para este diseño experimental con el programa *Statistix 4.0*.

En los experimentos con aplicación de CK se emplearon seis TGCs, adoptándose un **diseño en bloques divididos al azar en strip-plot** con tres bloques, empleándose una TGC con CO₂ ambiental y otra con CO₂ elevado en cada bloque. Las dos [CO₂] estaban adscritas a las parcelas completas dentro de los bloques, con los dos niveles de suministro de nitrógeno y la aplicación de CK frente al control dispuestos al azar en subparcelas dentro del tratamiento de CO₂, y los tres últimos estratos foliares incluidos dentro de las subparcelas. Se llevaron a cabo ANOVAs de los datos para este diseño experimental con el programa estadístico *Genstat 6.2*.

3.4.2. Análisis de paralelismo de las regresiones

Las relaciones lineales entre los parámetros A y Chl a+b o ART, entre N_A y Chl a+b o ART y entre N_A y E del experimento del año 2003 y la relación lineal entre g_s y A calculada por medio del modelo de Ball *et al.* (1987), estudiada en los experimentos con aspersión de CK se analizaron a través de regresiones, ajustándose los datos a rectas de la forma $y = a + bx$, donde *a* y *b* serán los parámetros de la regresión. Las rectas de regresión - ajustadas a los datos de cada tratamiento - se compararon a través de un análisis de paralelismo para

Materiales y Métodos

valorar si los datos en conjunto deben ajustarse a una recta común o a varias - si hubo diferencias significativas entre las rectas de cada tratamiento -, seleccionándose el modelo de regresión significativo ($P < 0.05$) con mayor separación de parámetros. Si sólo el parámetro a difiere entre las rectas pertenecientes a cada tratamiento, se obtienen rectas paralelas que difieren en el máximo. Con ambos parámetros diferentes, las rectas obtenidas mostrarán además diferencias en la pendiente.



4. Resultados

4.1. ANÁLISIS DE LA ACLIMATACIÓN AL CO₂ ELEVADO EN EL DOSEL VEGETAL CON DOS SUMINISTROS DE NITRÓGENO (AÑO 2003)

4.1.1. Intercambio gaseoso

Los parámetros de intercambio gaseoso (A , g_s y E) medidos en la antesis a $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ y $1500 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidad luminosa se redujeron significativamente al descender posiciones en el dosel vegetal, ya fuese con CO₂ elevado o ambiente, si bien en la interacción CO₂ x dosel (C.D) la disminución de E en el dosel fue más acusada en CO₂ ambiente que elevado (Tabla 4.1.1, Fig. 4.1.1 e, f). En general, el crecimiento con CO₂ elevado tendió a reducir A , g_s y E , pero sólo el efecto sobre E alcanzó significación estadística (Tabla 4.1.1, Fig. 4.1.1). El aporte nitrogenado abundante elevó A y no mostró efecto significativo sobre g_s y E (Tabla 4.1.1, Fig. 4.1.1).

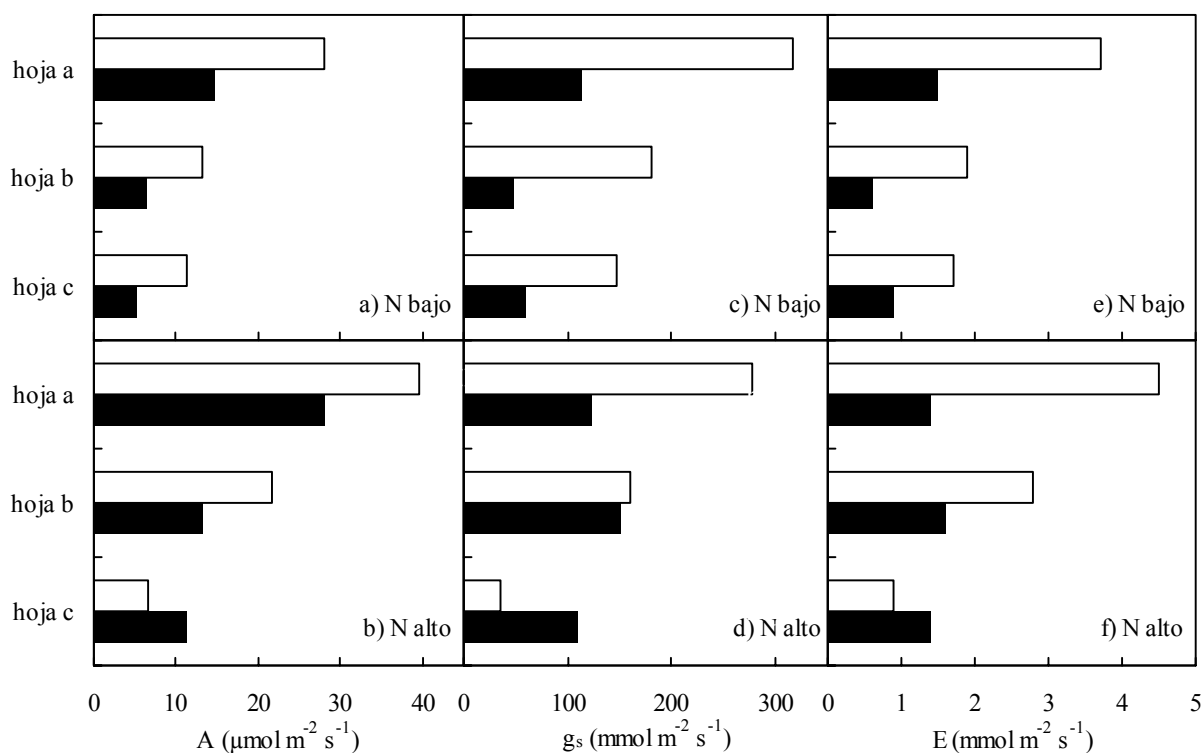


Figura 4.1.1 Valores medios de velocidad fotosintética (A), conductancia de los estomas (g_s) y transpiración (E) en las tres últimas hojas - hojas **a**, **b** y **c** - medidas durante la antesis de trigo de año 2003, en plantas crecidas con CO₂ ambiente (\square), o elevado (\blacksquare), con aporte de nitrógeno bajo (a, c, e) o abundante (b, d, f) en el experimento con TGCs. Las medidas se realizaron con $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂, $1500 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidad luminosa y $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Resultados

Tabla 4.1.1. Análisis de la varianza (valores de probabilidad *P*) para la velocidad fotosintética (A), conductancia de los estomas (g_s) y transpiración (E) medidas a $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$, clorofila total (chl a+b), actividad Rubisco inicial (ARI) y total (ART) por área verde, contenidos de nitrógeno en materia seca (%N), distribución de nitrógeno entre órganos (Nd) y contenidos de nitrógeno foliar en base al área (N_A) durante la antesis de trigo en el experimento de 2003 en plantas crecidas con CO_2 ambiente o elevado (C), diferentes dosis de nitrógeno (N) y distintos estratos del dosel vegetal (D); junto con las interacciones de estos factores.

	A	g_s	E	Chl a+b	ARI	ART	%N	Nd	N_A
CO_2 (C)	0.2	0.26	0.04	0.03	0.04	0.09	0.25	0.08	0.33
nitrógeno (N)	0.04	0.54	0.3	<.001	0.004	<.001	<.001	0.77	<.001
dosel/órgano (D)	<.001	0.03	0.007	0.03	<.001	<.001	<.001	<.002	<.001
C.N	0.68	0.49	0.84	0.08	0.27	0.04	0.33	0.73	0.12
C.D	0.12	0.11	0.04	0.46	0.19	0.02	0.001	<.001	<.001
N.D	0.34	0.6	0.5	0.71	0.43	0.073	<.001	<.001	<.001
C.N.D	0.58	0.97	0.52	0.96	0.53	0.77	0.84	0.89	0.29

En la hoja **a**, las respuestas de aclimatación al CO_2 alto de A y g_s fueron similares con ambas dosis de nitrógeno, pero en hojas inferiores esta aclimatación fue menor con nitrógeno abundante (Tabla 4.1.2) y en la hoja **c** incluso alcanzaron valores superiores a 1, lo que indica una aclimatación positiva al CO_2 elevado. En plantas que crecen con CO_2 ambiental, el aumento del CO_2 de medida de 370 a $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ - efecto directo - estimuló A. Por tanto, el efecto neto del CO_2 alto fue un descenso moderado de A con dosis menores de nitrógeno y un incremento de A de las hojas inferiores del dosel con la mayor dosis de nitrógeno (Tabla 4.1.2).

Como consecuencia de la reducción de g_s cuando el CO_2 de medida pasa de 370 a $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ - efecto directo sobre g_s menor que 1 -, excepto en la hoja **b** de las plantas con dosis bajas de fertilizante nitrogenado, el efecto neto del CO_2 alto fue una reducción de g_s , siendo esta reducción más acusada si el aporte de nitrógeno era menor (Tabla 4.1.2); una excepción fue el aumento de g_s en las hojas inferiores con suministro alto de nitrógeno, que fue similar al observado en A.

Tabla 4.1.2 Respuestas de aclimatación [P(e,E)/P(a,E)], directa [P(a,E)/P(a,A)] y neta [P(e,E)/P(a,A)] al CO₂ elevado de la velocidad fotosintética (A) y la conductancia estomática (g_s) durante la antesis en las tres últimas hojas de trigo, crecido en las TGCs en 2003, bajo diferentes [CO₂] y dos dosis de nitrógeno. P es el parámetro analizado (A o g_s), las letras minúsculas (a, e) indican la [CO₂] de crecimiento - ambiente o elevada respectivamente - y las letras mayúsculas (A, E) indican la [CO₂] de medida.

	Aporte de Nitrógeno	Dosel	Respuesta aclimatación	Respuesta directa	Respuesta neta
A	bajo	hoja a	0.52	1.47	0.77
		hoja b	0.47	1.84	0.87
		hoja c	0.45	2.17	0.97
	alto	hoja a	0.52	1.70	0.88
		hoja b	0.84	1.75	1.47
		hoja c	1.49	2.11	3.14
g _s	bajo	hoja a	0.36	0.76	0.27
		hoja b	0.26	1.12	0.29
		hoja c	0.40	0.69	0.27
	alto	hoja a	0.44	0.81	0.35
		hoja b	0.93	0.85	0.79
		hoja c	3.16	0.74	2.33

4.1.2. Contenido de clorofila

El contenido de clorofila total (Chl a+b) expresado en base al área foliar fue significativamente menor en CO₂ elevado que en ambiente en todos los estratos del dosel (Tabla 4.1.1, Fig. 4.1.2). Hubo menos contenido de Chl con déficit de nitrógeno y un gradiente negativo al bajar posiciones en el dosel vegetal, con ambas [CO₂] de crecimiento, aunque con CO₂ elevado y nitrógeno deficiente este gradiente fue débil (Tabla 4.1.1, Fig. 4.1.2).

Resultados

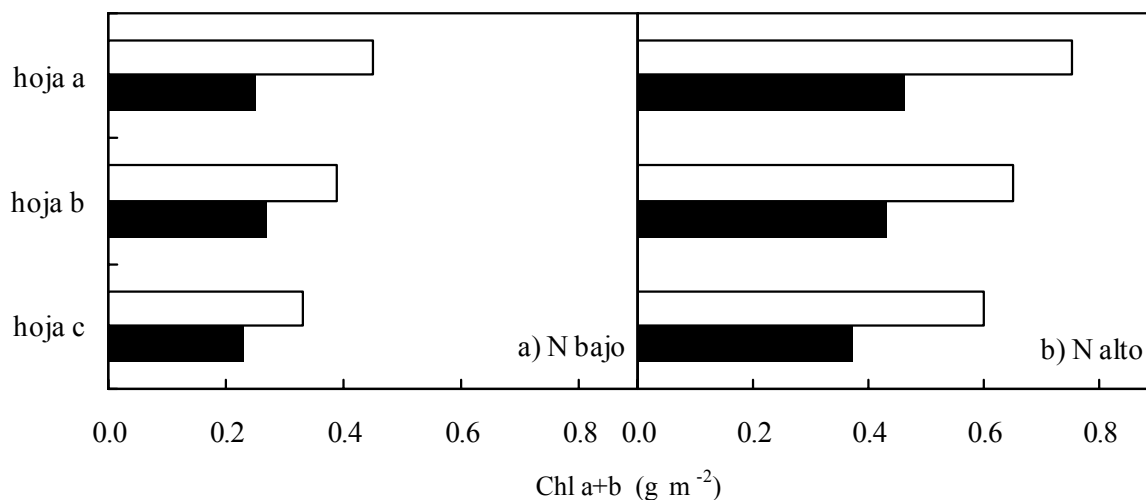


Figura 4.1.2 Contenidos de clorofila total (Chl a+b) en las hojas **a**, **b** y **c** expresados en base al área foliar (g m^{-2}), durante la antesis del trigo en el experimento del año 2003, en plantas crecidas en CO_2 ambiente (\square) o elevado (\blacksquare) y con aporte de nitrógeno bajo (a) o abundante (b).

4.1.3. Actividad Rubisco

La actividad Rubisco inicial (ARI) fue menor en CO_2 elevado que en ambiente en todos los estratos del dosel (Tabla 4.1.1, Fig. 4.1.3 a, b), acercándose a la significación ($P=0.09$) en el caso de la actividad Rubisco total (ART). Hubo menos actividad Rubisco con déficit de nitrógeno (Fig. 4.1.3) y un gradiente negativo al bajar posiciones en el dosel vegetal, pero el CO_2 elevado disminuyó más la ART con dosis alta de nitrógeno que con dosis baja y la interacción significativa $\text{CO}_2 \times$ dosel, indicó que el CO_2 alto redujo ART más en las hojas superiores del dosel que en las inferiores (Tabla 4.1.1, Fig. 4.1.3 c, d).

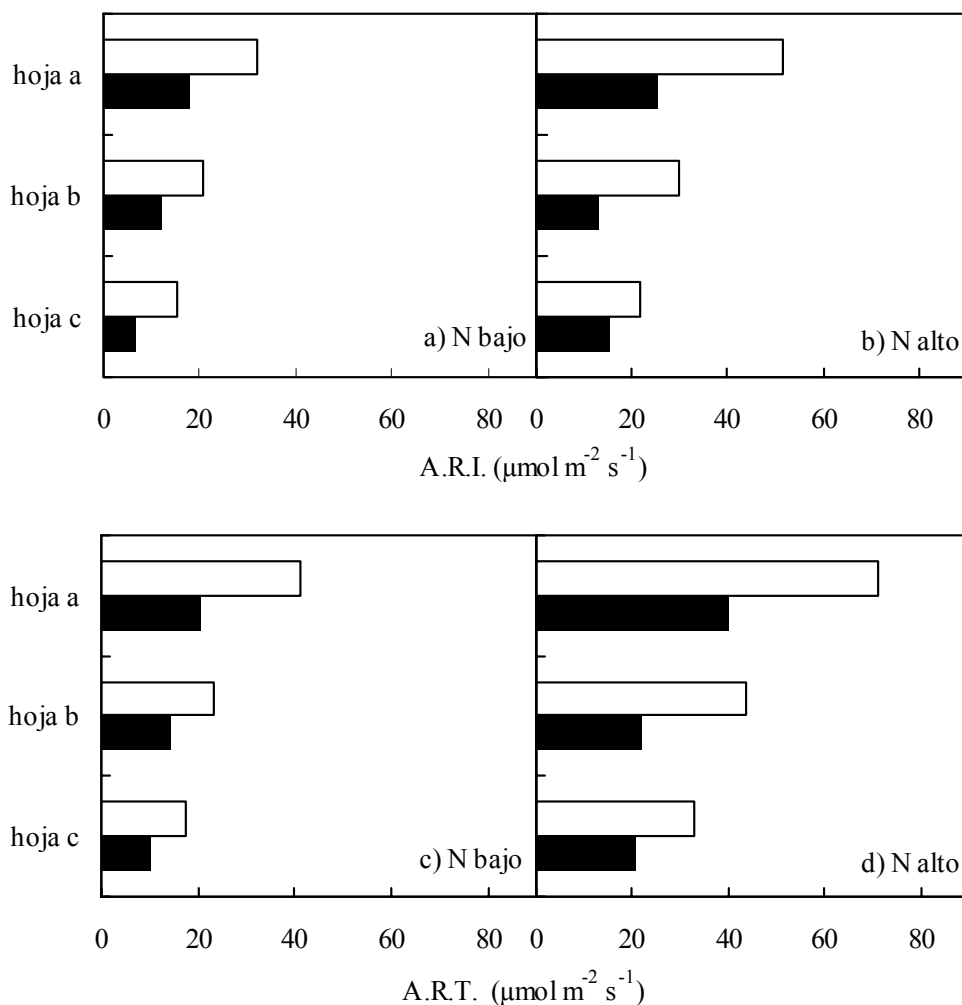


Figura 4.1.3 a, b) Actividad Rubisco inicial (ARI) y c, d) actividad Rubisco total (ART) por unidad de superficie verde en las hojas **a**, **b** y **c**, en plantas del experimento con trigo del 2003 crecidas en CO_2 ambiente (□) o CO_2 elevado (■) y con aporte bajo (a, c) o abundancia de nitrógeno (b, d).

4.1.4. Contenidos de nitrógeno

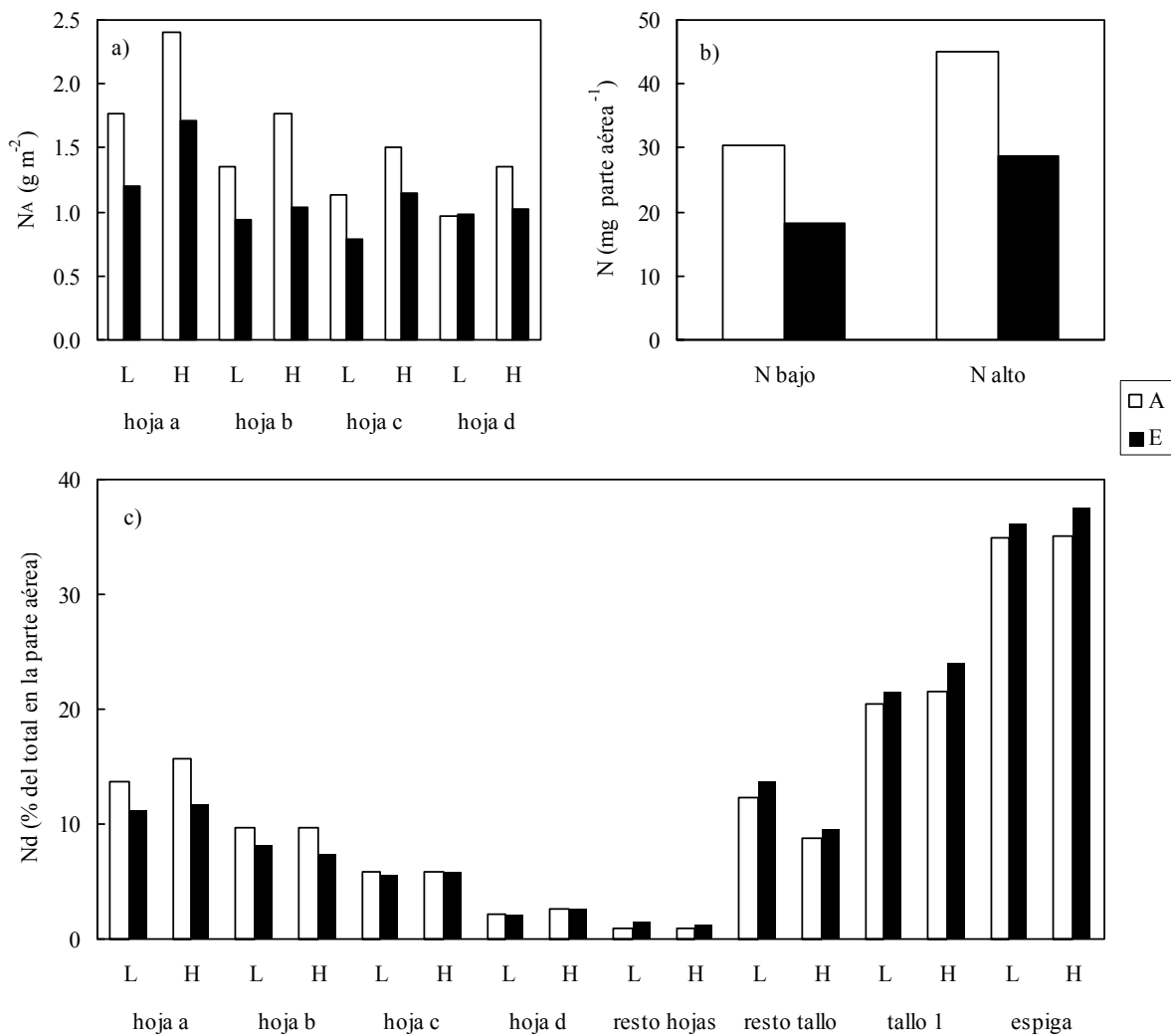
Como se aprecia en la Tabla 4.1.1, los resultados obtenidos cuando el nitrógeno se expresa en base a la materia seca (%N) fueron muy similares a los que hubo si este parámetro se expresa en base al área verde (N_A), ya que el peso seco por unidad de superficie (LMA) no fue afectado por el CO_2 o la dosis de nitrógeno - no mostrado -.

El CO_2 elevado redujo el N_A y %N, si la dosis de fertilizante nitrogenado era baja, en todos los niveles foliares analizados (Tabla 4.1.1, Fig. 4.1.4 a), excepto en la hoja **d**. Estos parámetros disminuyeron al descender posiciones en el dosel, y aunque la interacción CO_2 x nitrógeno x dosel (C.N.D) no alcanzó significación, el mayor aporte de nitrógeno combinado con CO_2 alto mantuvo niveles similares de nitrógeno en las hojas **b**, **c** y **d** (Fig.

Resultados

4.1.4 a). La abundancia de nitrógeno aumentó N_A (Fig. 4.1.4 a) y %N en las hojas **a, b y c** (Tabla 4.1.1). El nitrógeno total de la parte aérea (N) fue menor con CO_2 elevado y con dosis bajas de nitrógeno (Fig. 4.1.4 b).

Figura 4.1.4 a) Contenido de nitrógeno por unidad de superficie foliar (N_A), b) nitrógeno total en la parte aérea de la planta (N) y c) distribución de nitrógeno entre órganos de la planta (Nd), en la antesis de trigo crecido con CO_2 ambiente (A) o elevado (E), con deficiencia (L) o abundancia de nitrógeno (H) del experimento en las TGCs del 2003.



Con respecto a la distribución porcentual del nitrógeno entre órganos (Nd), el CO₂ alto incrementó su adscripción a la espiga, tallo y resto de hojas, mientras que redujo Nd en las hojas **a** y **b** sin afectar a las hojas **c** y **d** (Fig. 4.1.4 c). El aporte abundante de nitrógeno incrementó el porcentaje adscrito a la espiga y el tallo 1, redujo Nd del resto del tallo y careció de efecto en el resto de hojas (Fig. 4.1.4 c). Con CO₂ elevado la adición de más nitrógeno no elevó la adscripción a la hoja **a**, pero sí lo hizo con CO₂ ambiente - efecto no significativo, ns - y esta mayor dosis de nitrógeno tendió a disminuir la adscripción a la hoja **b** con CO₂ alto sin tener efecto con CO₂ ambiental (Fig. 4.1.4 c).

4.1.5. Relaciones lineales entre parámetros

Las relaciones entre A medida a $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 y Chl a+b o ART fueron positivas y se ajustaron a una recta de regresión común para las hojas **a**, **b** y **c**, los dos niveles de CO_2 y los dos suministros de nitrógeno (Fig. 4.1.5 a, b). A su vez, Chl a+b y ART se relacionaron positivamente también con N_A (Fig. 4.1.5 c, d).

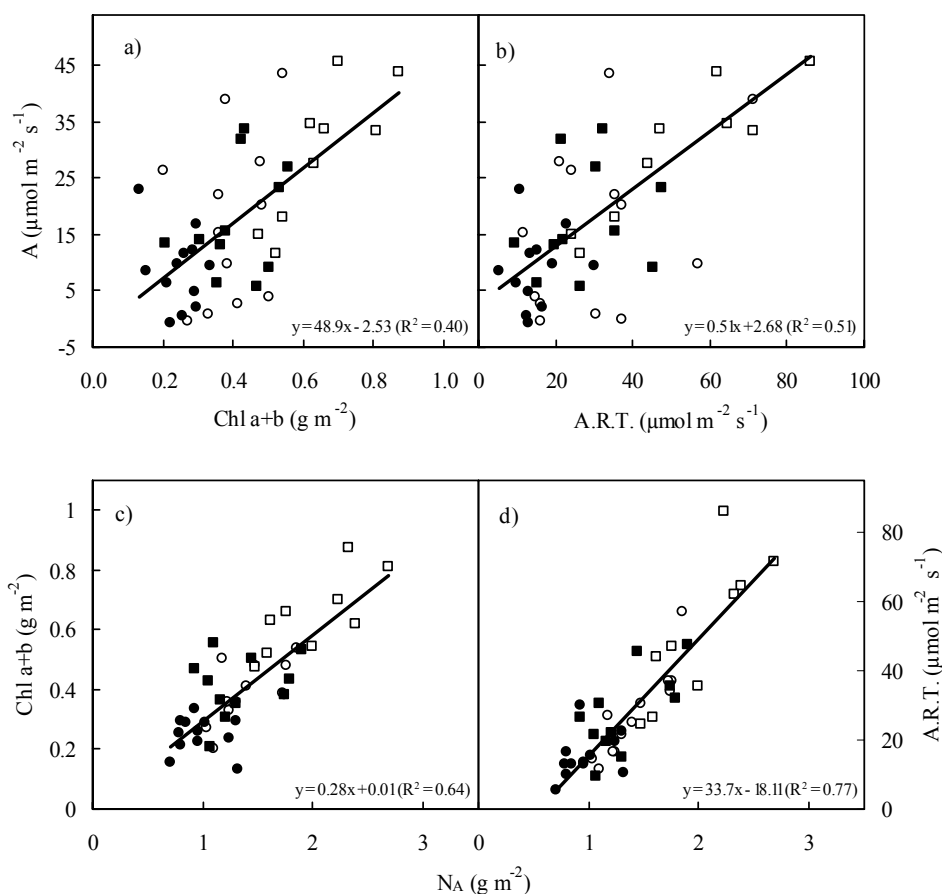


Figura 4.1.5 Relación de la velocidad fotosintética (A), medida a $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , $1500 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidad luminosa y $25 \text{ }^\circ\text{C}$ con a) la concentración de clorofila total (Chl a+b) y b) con la actividad Rubisco total (ART); relaciones de c) el contenido en clorofila total (Chl a+b) y d) la actividad Rubisco total con el contenido de nitrógeno por unidad de superficie (N_A), para las hojas **a**, **b** y **c** en la antesis de 2003. Las plantas de trigo crecieron en TGCs con CO_2 ambiente (\square, \circ) o elevado (\blacksquare, \bullet) y con deficiencia (\bullet, \circ) o abundancia de nitrógeno (\blacksquare, \square).

En cuanto a la relación entre N_A y E medidas a la $[CO_2]$ de crecimiento e irradiancia alta, en la antesis se encontró una correlación positiva que explicaba un 51% de la variación de los datos para todas las hojas, $[CO_2]$ de crecimiento y aportes de nitrógeno (Fig. 4.1.6).

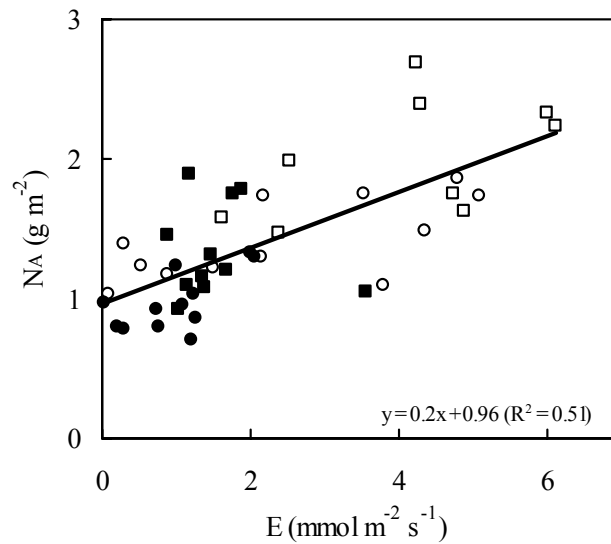


Figura 4.1.6 Relación entre el contenido de nitrógeno foliar (N_A) y la velocidad de transpiración por unidad de superficie foliar (E) medida a la $[CO_2]$ de crecimiento para las hojas **a**, **b** y **c** en la antesis de 2003. Las plantas de trigo crecieron en CO_2 ambiente (\square, \circ) o elevado (\blacksquare, \bullet) y con deficiencia (\bullet, \circ) o abundancia de nitrógeno (\blacksquare, \square). Las medidas de transpiración se realizaron con intensidad luminosa de $1500\ \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ y temperatura de la hoja de $25\ ^\circ C$.

4.2. ANÁLISIS DEL PAPEL DEL NITRÓGENO Y LA CITOQUININA EN LA ACLIMATACIÓN AL CO₂ ELEVADO (AÑOS 2006 Y 2007)

4.2.1. Velocidad fotosintética, conductancia estomática y transpiración

4.2.1.1 Experimento de 2006

Los análisis de la varianza de los parámetros de intercambio gaseoso (A, g_s y E) medidos con 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ y 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa a los tres días después de la anthesis - 3 dda - mostraron una interacción CO₂ x nitrógeno x dosel (C .N.D) significativa, la cual indicó que la adición de más nitrógeno disminuyó el intercambio gaseoso en CO₂ ambiente - la disminución en la hoja **b** no alcanzó significación -, pero este efecto no fue significativo en CO₂ elevado (Tabla 4.2.1, Fig. 4.2.1); con altas [CO₂] la A tendió a aumentar en la hoja **a** si el nitrógeno era abundante (Fig. 4.2.1). Adicionalmente, dichos parámetros mostraron un gradiente de mayor a menor al descender posiciones en el dosel vegetal. La aplicación de CK no tuvo efectos significativos en el intercambio gaseoso de las hojas (Tabla 4.2.1).

Tabla 4.2.1. Análisis de la varianza - valores de probabilidad, *P* - para la velocidad fotosintética (A, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), conductancia estomática (g_s , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), y transpiración (E, $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), en los distintos estratos del dosel vegetal (D), del trigo crecido en TGCs, con CO₂ ambiente o elevado (C), dos dosis de nitrógeno (N), y la adición o no de citoquinina (K) durante los años 2006 y 2007. Los números en negrita representan efectos significativos.

	2006			2007			2007		
	antesis			emergencia espiga			antesis		
	A	g_s	E	A	g_s	E	A	g_s	E
CO ₂ (C)	0.75	0.88	0.51	0.045	0.32	0.53	0.06	0.14	0.09
Citoquinina (K)	0.71	0.98	0.65	0.12	0.05	0.045	0.17	0.28	0.19
Nitrógeno (N)	0.007	0.002	0.005	0.005	0.44	0.42	0.09	0.23	0.13
Dosel (D)	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	0.04	0.05
C.K	0.96	0.96	0.9	0.83	0.52	0.29	0.94	0.77	0.52
C.N	0.028	0.012	0.044	0.02	0.13	0.16	0.18	0.16	0.14
K.N	0.83	0.85	0.96	0.04	0.46	0.38	0.02	0.009	0.003
C.D	0.28	0.39	0.08	0.1	0.54	0.93	0.02	0.08	0.16
K.D	0.54	0.75	0.54	0.42	0.009	0.05	0.75	0.77	0.72
N.D	0.64	0.36	0.77	0.29	0.31	0.51	0.005	0.071	0.03
C.K.N	0.87	0.66	0.51	0.75	0.72	0.97	0.63	0.3	0.32
C.K.D	0.601	0.70	0.61	0.18	0.025	0.027	0.46	0.54	0.52
C.N.D	0.029	0.01	0.02	0.09	0.1	0.2	0.77	0.93	0.84
C.K.N.D	0.77	0.98	0.9	0.1	0.3	0.44	0.55	0.84	0.92

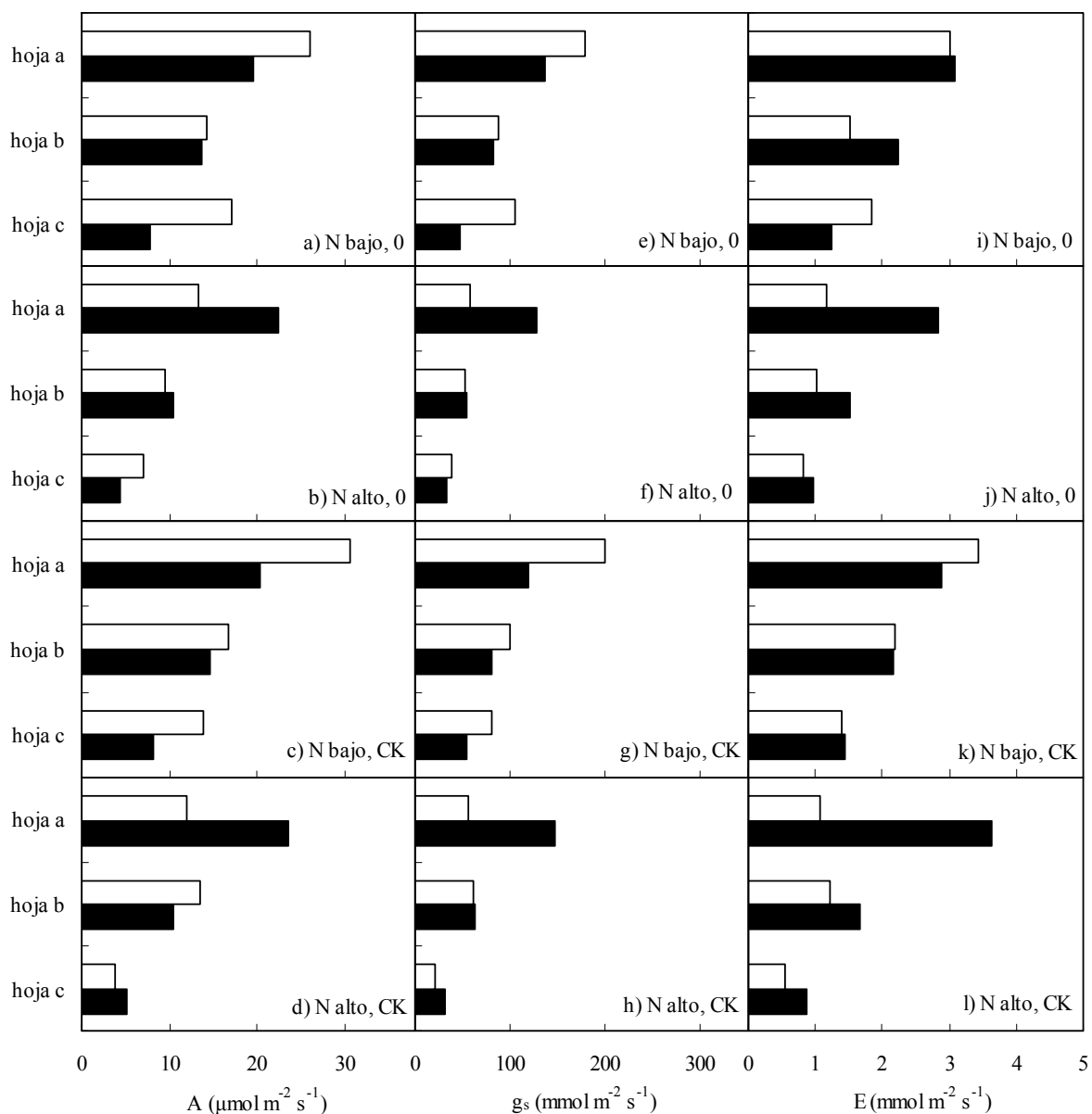


Figura 4.2.1. Velocidad fotosintética (A), conductancia de los estomas (g_s) y transpiración (E) medidas a los tres días del comienzo de antesis en 2006 en las tres últimas hojas del dosel vegetal - hojas **a**, **b** y **c** - del trigo crecido en TGCs con CO₂ ambiente (□), o elevado (■), con aporte de nitrógeno bajo (a, c, e, g, i, k) o abundante (b, d, f, h, j, l) y sin (a, b, e, f, i, j) o con aspersión de citoquinina (c, d, g, h, k, l). Las medidas se realizaron con 700 μmol mol⁻¹ de CO₂, 1500 μmol m⁻² s⁻¹ de intensidad luminosa y 25 °C.

Generalmente, las respuestas de aclimatación de A y g_s al aumento de CO₂ en la atmósfera (Tabla 4.2.2) fueron menores que 1, reflejando una pérdida de capacidad fotosintética y un cierre de los estomas inducidos por el crecimiento prolongado en CO₂ alto, excepto en las que recibieron nitrógeno abundante, donde el CO₂ alto en general habría favorecido su intercambio gaseoso. Las respuestas directas de A al CO₂ fueron, por el contrario, mayores que 1, dado el efecto estimulante a corto plazo del aumento del CO₂. Los valores generalmente mayores que 1 de las respuestas directas de g_s al CO₂ indican que en 2006 el aumento de la concentración de éste no indujo un cierre de los estomas (Tabla

Resultados

4.2.2). El nitrógeno en dosis alta aumentó las respuestas de aclimatación - minoró la regulación negativa - de A y g_s al CO₂ alto en todas las hojas del dosel vegetal, y aumentó también la respuesta directa de A al CO₂ en las hojas **a** y **c**, pero no en la **b**; en ésta, la respuesta directa de A al CO₂ elevado disminuyó con el nitrógeno. A diferencia con A, la respuesta directa de g_s al CO₂ elevado fue menor en todas las hojas con nitrógeno en dosis alta que baja. En consecuencia, el nitrógeno alto aumentó la respuesta neta de A y g_s al CO₂ elevado en las hojas **a** y **c**, pero no en la hoja **b**. La aplicación de CK disminuyó las respuestas de aclimatación y directa con aporte bajo de nitrógeno pero no afectó a estas respuestas, o bien las elevó, cuando recibían nitrógeno en abundancia, excepto por una disminución de la respuesta de aclimatación de A en la hoja **b** (Tabla 4.2.2). Así, en las hojas **a** y **c** la CK aumentó las respuestas netas de A y g_s al CO₂ atmosférico con la mayor dosis de nitrógeno y las redujo en las hojas **a** y **b**, pero las aumentó en la **c**, si el aporte era bajo.

Tabla 4.2.2. Respuestas de aclimatación $[P(e,E)/P(a,E)]$, directa $[P(a,E)/P(a,A)]$ y neta $[P(e,E)/P(a,A)]$ al CO₂ elevado de la velocidad fotosintética (A) y la conductancia estomática (g_s) durante la antesis de 2006 en las tres últimas hojas de trigo crecido en las TGCs bajo diferentes [CO₂], dos aportes de nitrógeno y la adición (CK) o no (0) de citoquinina. P es el parámetro analizado (A o g_s), las letras minúsculas (a, e) indican la [CO₂] - ambiente o elevado - de crecimiento y las letras mayúsculas (A, E) indican la [CO₂] de medida.

	Aporte de Nitrógeno	dosel	Respuesta aclimatación		Respuesta directa		Respuesta neta	
			0	CK	0	CK	0	CK
A	bajo	hoja a	0.75	0.67	1.93	1.90	1.46	1.27
		hoja b	0.95	0.87	2.93	2.88	2.79	2.50
		hoja c	0.45	0.59	3.24	3.01	1.46	1.78
	alto	hoja a	1.69	1.96	2.08	2.50	3.52	4.92
		hoja b	1.10	0.77	1.90	2.08	2.10	1.60
		hoja c	0.63	1.32	4.90	4.20	3.09	5.55
g_s	bajo	hoja a	0.76	0.59	1.42	1.04	1.08	0.62
		hoja b	0.94	0.81	1.24	1.16	1.17	0.94
		hoja c	0.44	0.67	1.72	1.43	0.76	0.96
	alto	hoja a	2.21	2.63	0.99	1.00	2.19	2.62
		hoja b	1.03	1.03	0.93	0.93	0.96	0.96
		hoja c	0.88	1.45	1.56	0.86	1.17	1.25

4.2.1.2 Experimento de 2007

El CO₂ y el nitrógeno tuvieron una interacción sobre la fotosíntesis medida con 700 μmol mol⁻¹ de CO₂ y 1500 μmol m⁻² s⁻¹ de irradiancia antes de la emergencia de la espiga (Tabla 4.2.1), de modo que la [CO₂] alta disminuyó A en menor medida con nitrógeno abundante que bajo; a su vez, la adición de más nitrógeno no tuvo efecto en A para las plantas crecidas en CO₂ ambiente, pero la aumentó en las crecidas en CO₂ elevado (Fig. 4.2.2). También hubo una interacción entre nitrógeno y CK (Tabla 4.2.1), que indica cómo la aspersión con CK combinada con nitrógeno abundante aumentó A, pero con nitrógeno bajo no tuvo efecto (Fig. 4.2.2); este parámetro aumentó con el nitrógeno combinado con CK, pero no sin ella. La aplicación de CK incrementó g_s y E en la emergencia de la espiga (Fig. 4.2.2), aunque el efecto sólo alcanzó significación en la hoja **a** de plantas crecidas en CO₂ elevado - interacción CO₂ x CK x D - y por último el intercambio gaseoso disminuyó al descender posiciones sucesivas del dosel vegetal (Tabla 4.2.1).

En las medidas realizadas después de la antesis - 10 dda - el CO₂ elevado disminuyó A de la última hoja - hoja **a** -, pero esta disminución no alcanzó significación en la hoja **b**; la diferencia en A entre estas dos hojas fue significativa en CO₂ ambiente, pero no en CO₂ elevado (Fig. 4.2.3). Como en la emergencia de la espiga, la interacción entre nitrógeno y CK fue significativa también después de la antesis (Tabla 4.2.1), pero en esta fecha la aspersión de dicha hormona no afectó al intercambio gaseoso con nitrógeno abundante y lo disminuyó si el aporte nitrogenado era menor (Fig. 4.2.3), además la adición de más nitrógeno aumentó g_s y E cuando se combinó con CK, pero no les afectó - tendió a disminuirlos - en plantas control sin CK (Fig. 4.2.3). La mayor dosis de nitrógeno aumentó la fotosíntesis en la hoja **a**, pero no en la **b**, y estas dos hojas mostraron valores similares de A con nitrógeno bajo, y valores más altos en la hoja **a** que la **b** con nitrógeno abundante (Fig. 4.2.3).

Resultados

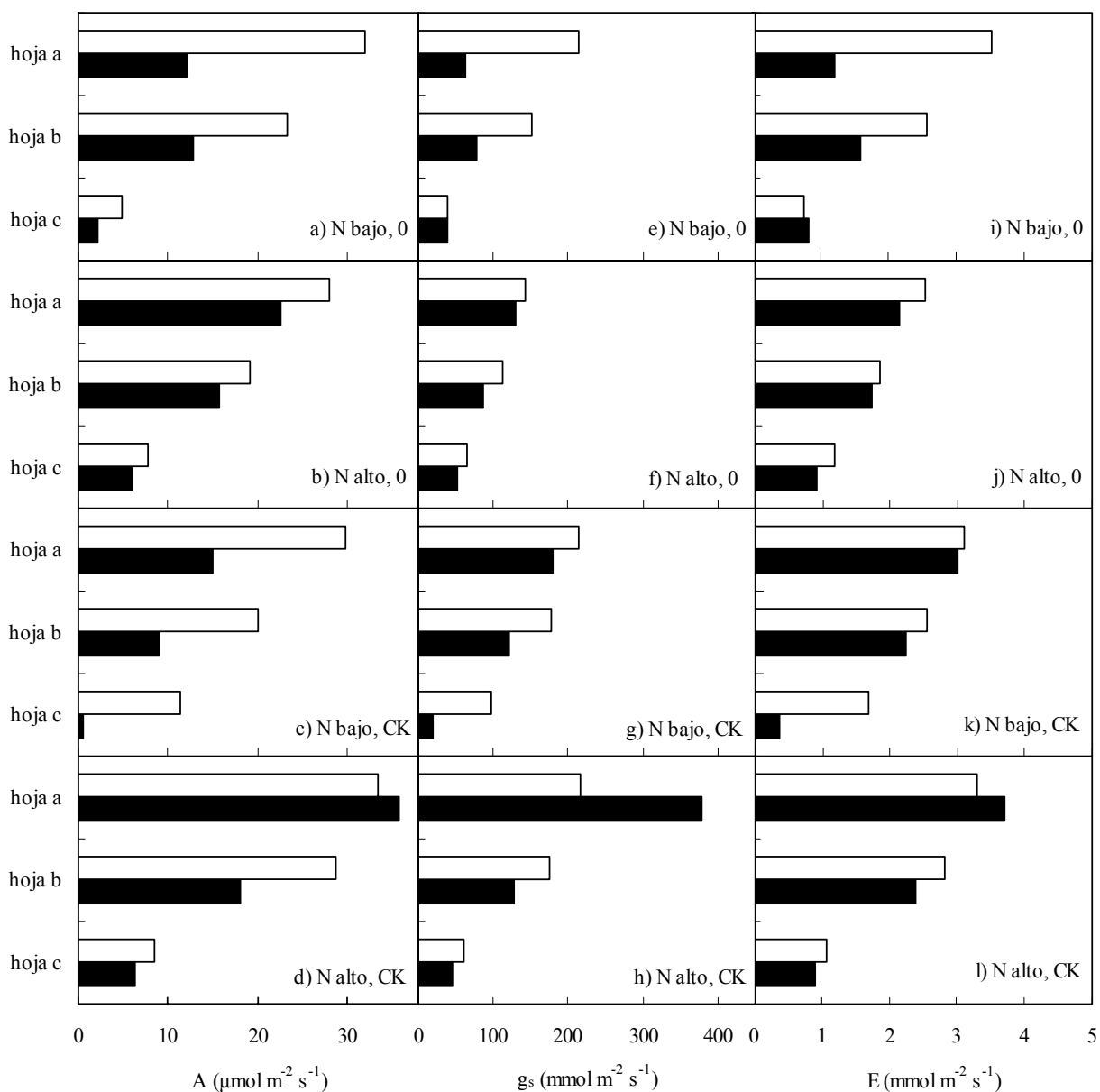


Figura 4.2.2. Velocidad fotosintética (A), conductancia de los estomas (g_s) y transpiración (E) medidos diez días antes de la emergencia de la espiga en las tres últimas hojas de trigo del experimento en las TGCs de 2007, con CO_2 ambiente (\square) o elevado (\blacksquare), con aporte de nitrógeno bajo (a, c, e, g, i y k) o abundante (b, d, f, h, j y l) y sin (a, b, e, f, i y j) o con aspersión de citoquinina (c, d, g, h, k y l). Las medidas se realizaron con $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , $1500 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidad luminosa y $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

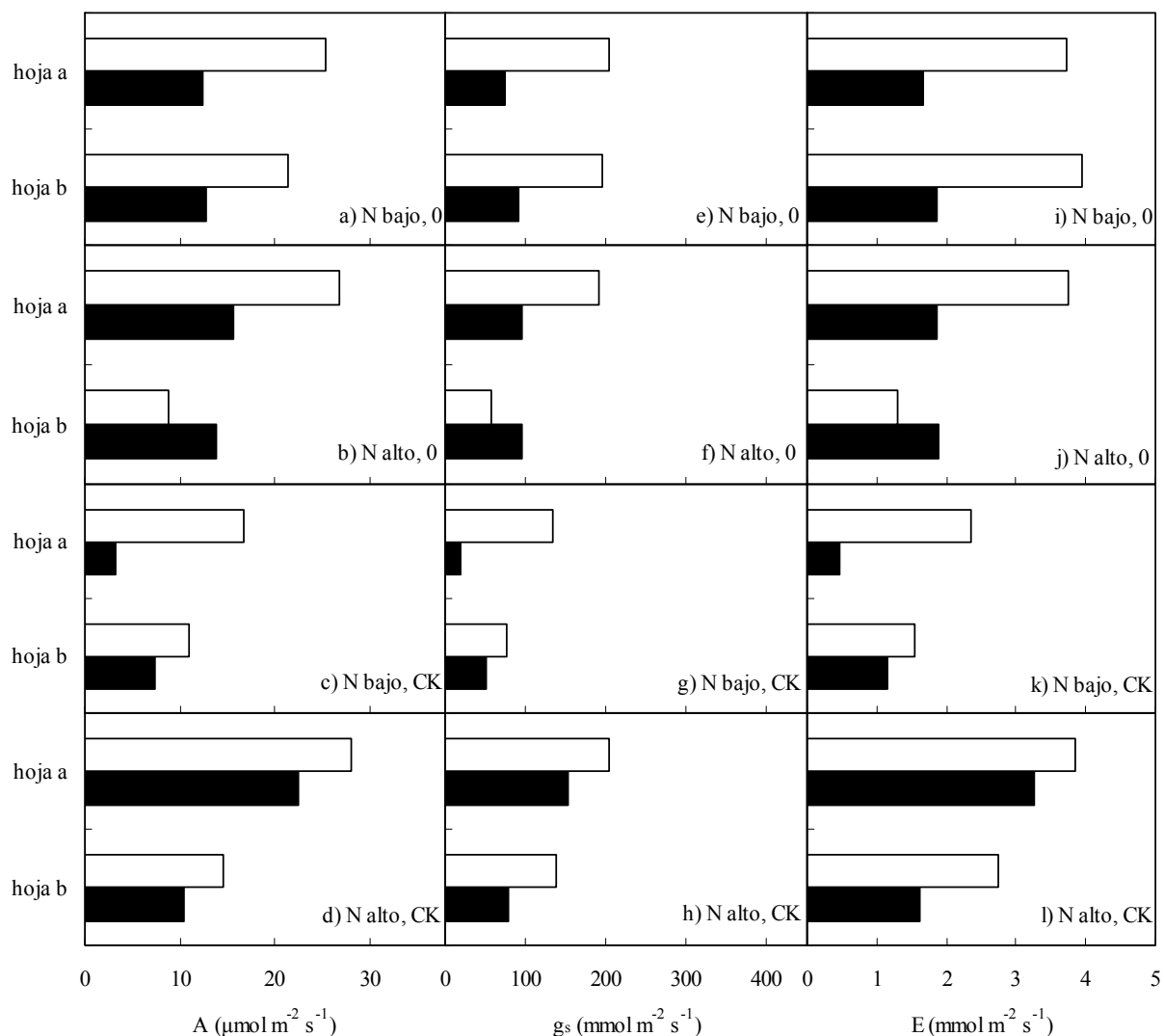


Figura 4.2.3. Velocidad fotosintética (A), conductancia de los estomas (g_s) y transpiración (E) diez días después de la antesis del año 2007 en las dos últimas hojas - hojas **a** y **b** - del experimento con trigo crecido en las TGCs con CO_2 ambiente (\square) o elevado (\blacksquare), con aporte de nitrógeno bajo (a, c, e, g, i y k) o abundante (b, d, f, h, j y l) y sin (a, b, e, f, i y j) o con aspersión de citoquinina (c, d, g, h, k y l). Las medidas se realizaron con $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , $1500 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de intensidad luminosa y $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Resultados

Antes de la emergencia de la espiga en 2007, los valores generalmente menores que 1 de las respuestas directas de g_s al CO_2 (Tabla 4.2.3) indicaron que el aumento instantáneo de la concentración de CO_2 indujo un cierre de los estomas. El nitrógeno en dosis alta aumentó las respuestas de aclimatación de A y g_s al CO_2 alto en todas las hojas del dosel vegetal, y aumentó también la respuesta directa de A al CO_2 en la hoja **a**, pero no en las restantes; en éstas, las respuestas directas al CO_2 elevado disminuyeron con el nitrógeno (Tabla 4.2.3). En consecuencia, el nitrógeno alto aumentó la respuesta neta de A al CO_2 elevado en las distintas hojas del dosel, así como la respuesta neta de g_s de la hoja **a**, pero no de las hojas inferiores en el dosel.

La aplicación de CK sólo aumentó la respuesta de aclimatación - menor regulación negativa - al CO_2 elevado de A y g_s en la hoja **a** con ambas dosis de nitrógeno y la respuesta de aclimatación de g_s en la hoja **b** de las plantas que recibieron la menor cantidad de nitrógeno (Tabla 4.2.3). La CK aumentó también la respuesta directa de A en las hojas **a**, **b** y, con nitrógeno bajo, en la hoja **c**. La CK incrementó la respuesta directa de g_s en las hojas **b** y **c** con ambas dosis de fertilizante nitrogenado. Por consiguiente, la CK sólo aumentó la respuesta neta al CO_2 elevado de A en la hoja **a** y de g_s en las hojas **a** y **b** con las dos dosis de nitrógeno.

Diez días después de la antesis, la mayor dosis de nitrógeno aumentó la respuesta de aclimatación de A y g_s en las hojas **a** y **b** (Tabla 4.2.3). También aumentó la respuesta directa de estos parámetros en plantas que recibieron CK, pero la disminuyó en plantas sin CK. Como resultado, la respuesta neta de A y g_s en las dos hojas fue mayor al recibir más nitrógeno (Tabla 4.2.3). La aplicación de CK aumentó las respuestas de aclimatación al CO_2 elevado de A y g_s en la hoja **a** cuando el aporte de nitrógeno era abundante y las redujo con la menor dosis de nitrógeno (Tabla 4.2.3); la CK disminuyó, en cambio, las respuestas de aclimatación de A y g_s en la hoja **b** con nitrógeno abundante (Tabla 4.2.3). Esta hormona aumentó la respuesta directa de A y g_s en ambas hojas con aporte nitrogenado alto y la disminuyó con nitrógeno bajo. Así, con la mayor dosis de nitrógeno, la CK elevó la respuesta neta de A y g_s en la hoja **a**, pero con dosis baja de nitrógeno la redujo. Por el contrario, en la hoja **b** la CK disminuyó la respuesta neta de A y g_s con dosis alta de nitrógeno y la aumentó sólo ligeramente con dosis baja del nutriente (Tabla 4.2.3).

Tabla 4.2.3. Respuestas de aclimatación [P(e,E)/P(a,E)], directa [P(a,E)/P(a,A)] y neta [P(e,E)/P(a,A)] al CO₂ elevado de la velocidad fotosintética (A) y la conductancia estomática (g_s) antes de la emergencia de la espiga y después de antesis del año 2007, en las tres últimas hojas de trigo crecido en las TGCs con CO₂ ambiente o elevado, dos dosis de nitrógeno y la adición (CK) o no (0) de citoquinina. P es el parámetro analizado (A o g_s), las letras minúsculas (a, e) indican la [CO₂] - ambiente o elevado - de crecimiento y las letras mayúsculas (A, E) indican la [CO₂] de medida.

	Aporte de Nitrógeno	dosel	Respuesta aclimatación		Respuesta directa		Respuesta neta	
			0	CK	0	CK	0	CK
Emergencia								
A	bajo	hoja a	0.38	0.50	1.65	1.75	0.62	0.88
		hoja b	0.55	0.45	1.70	1.85	0.93	0.82
		hoja c	0.46	0.04	2.32	2.64	1.05	0.12
	alto	hoja a	0.81	1.07	2.13	2.14	1.72	2.28
		hoja b	0.82	0.63	1.50	1.66	1.24	1.04
		hoja c	0.76	0.73	1.71	1.60	1.30	1.17
g _s	bajo	hoja a	0.29	0.84	0.82	0.89	0.24	0.74
		hoja b	0.52	0.68	0.80	0.96	0.41	0.65
		hoja c	0.98	0.20	0.93	1.05	0.91	0.21
	alto	hoja a	0.90	1.75	1.00	0.97	0.90	1.69
		hoja b	0.77	0.73	0.65	0.77	0.50	0.56
		hoja c	0.80	0.76	0.70	0.74	0.56	0.56
Antesis								
A	bajo	hoja a	0.49	0.20	1.60	1.48	0.78	0.29
		hoja b	0.60	0.67	1.63	1.54	0.97	1.04
	alto	hoja a	0.58	0.80	1.57	1.70	0.91	1.37
		hoja b	1.59	0.72	1.45	1.62	2.30	1.17
g _s	bajo	hoja a	0.37	0.15	0.80	0.79	0.29	0.12
		hoja b	0.47	0.66	0.75	0.69	0.35	0.45
	alto	hoja a	0.50	0.75	0.75	0.88	0.38	0.65
		hoja b	1.64	0.57	0.62	0.92	1.01	0.53

4.2.2.

Relación entre la conductancia de los estomas (g_s) y la fotosíntesis

4.2.2.1 Experimento de 2006

Poco después de la antesis - 3 dda -, la aspersión con CK no modificó la regresión g_s -A·Hr/Ca (Ball *et al.* 1987) cuando se analizaron los estratos foliares de estudio - hojas **a**, **b** y **c** -, niveles de CO₂ y dosis de nitrógeno en conjunto (Tabla 4.2.4). Separando las distintas hojas del dosel y las concentraciones de CO₂ de crecimiento, sólo hubo un efecto significativo de la CK en la regresión obtenida para las hojas penúltimas - hoja **b** - y con CO₂ ambiente; en éstas, la ordenada en el origen fue mayor, pero la pendiente fue menor, en las plantas que recibieron CK - no mostrado -. La aplicación de más nitrógeno no tuvo efecto significativo en la regresión g_s -A·Hr/Ca y el CO₂ elevado en cambio, sí varió ambos parámetros de las rectas de regresión (Tabla 4.2.4).

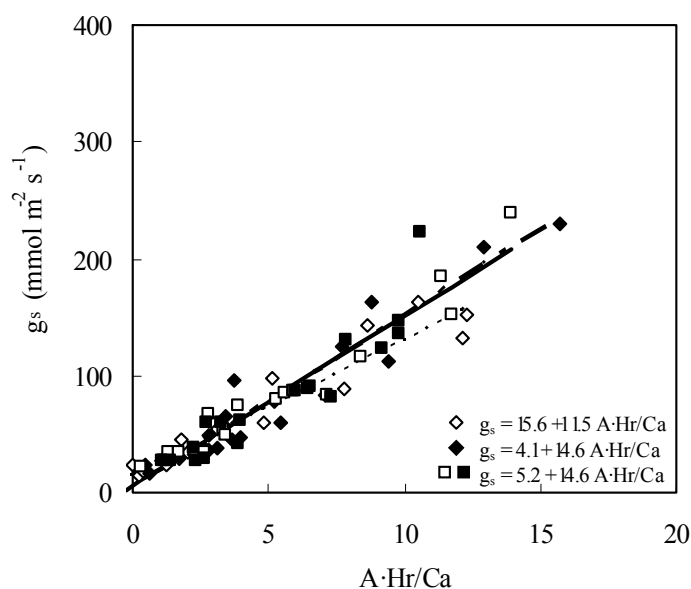


Figura 4.2.4. Efecto de la [CO₂] y la aplicación de citoquinina (CK) sobre el modelo de Ball *et al.* (1987) de la conductancia estomática ($g_s = g_0 + g_1 A \cdot Hr / Ca$) en las hojas **a**, **b** y **c** del experimento de 2006 con plantas de trigo crecidas en TGCs con CO₂ ambiente (símbolos abiertos) o elevado (símbolos cerrados) y combinado con dos dosis de nitrógeno y la adición (\square , \blacksquare) o no (\diamond , \blacklozenge) de CK. Plantas control sin CK, en CO₂ ambiente línea punteada y en CO₂ elevado línea continua; plantas con CK en CO₂ ambiente y elevado línea común (puntos y líneas). Las medidas se realizaron con 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, 25 °C de temperatura y 370 o 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂, para plantas crecidas en CO₂ ambiente o en CO₂ elevado respectivamente. Las regresiones comunes o por separado fueron ajustadas a los tratamientos de acuerdo con el análisis de paralelismo de la Tabla 4.2.4.

Analizando separadamente las plantas sin y con aspersión de CK (Tabla 4.2.4, Fig. 4.2.4), en las primeras la regresión g_s -A·Hr/Ca fue significativamente diferente en plantas de CO₂ ambiente y elevado, mostrando menor ordenada en el origen y mayor pendiente con CO₂ elevado (Fig. 4.2.4). En las plantas con CK, en cambio, la [CO₂] no tuvo efecto en la

regresión estudiada y la recta de regresión obtenida fue muy similar a la que hubo con CO₂ elevado (Fig. 4.2.4).

4.2.2.2 Experimento de 2007

Diez días antes de la emergencia de la espiga, la adición de CK modificó significativamente la regresión $g_s \cdot A \cdot \text{Hr} / \text{Ca}$ (Tabla 4.2.4) cuando se analizaron los estratos foliares de estudio, niveles de CO₂ y dosis de nitrógeno en conjunto, aumentando tanto la ordenada en el origen como la pendiente, de modo que los valores de g_s fueron mayores para aquellas plantas que recibieron CK (Fig. 4.2.5 a). El efecto de CK se encontró tanto en plantas crecidas bajo CO₂ ambiente como en CO₂ elevado; en las primeras la CK aumentó la ordenada en el origen sin afectar a la pendiente, y en las últimas la CK disminuyó la ordenada en el origen, pero aumentó la pendiente, de modo que los valores de g_s fueron mayores con CK que sin ella en casi todo el margen de valores de $A \cdot \text{Hr} / \text{Ca}$ (Fig. 4.2.5 b). La aplicación de más nitrógeno o diferentes [CO₂] de crecimiento no modificaron el modelo de Ball *et al.* en este estadio - no mostrado -.

En la última hoja del dosel - hoja **a** -, tampoco hubo diferencias con respecto al CO₂ (Tabla 4.2.4). En esta hoja, el efecto de CK se observó con las dos [CO₂] analizadas conjuntamente y con cada [CO₂] separadamente (Tabla 4.2.4). La aspersion con CK aumentó los valores de g_s para valores dados de $A \cdot \text{Hr} / \text{Ca}$ al aumentar la ordenada en el origen de la regresión tanto en plantas con CO₂ ambiente como elevado, y en la regresión con valores de las dos [CO₂], también la pendiente (Tabla 4.2.4). En la regresión para plantas en CO₂ elevado, CK disminuyó la ordenada en el origen y aumentó la pendiente de la regresión, resultado igualmente en valores de g_s mayores con el empleo de esta hormona - no mostrado -.

En la hoja **b** se observó también que la adición de CK aumentó la ordenada en el origen, al igual que en la hoja **a** (Tabla 4.2.4), resultando una línea de regresión con mayor elevación que la correspondiente al control sin CK, sin embargo, al analizar por separado las plantas crecidas bajo [CO₂] ambiente y elevada, las regresiones no fueron significativamente diferentes (Tabla 4.2.4). Así que la CK fue capaz de elevar g_s también de la hoja **b**, con independencia de la [CO₂] de crecimiento. En la hoja **c** las regresiones no alcanzaron diferencias significativas - no mostrado -.

Tabla 4.2.4. Probabilidades en el análisis de paralelismo del modelo de Ball *et al.* (1987) para la g_s de las hojas **a**, **b** y **c** en plantas con CO₂ ambiente (A) o elevado (E), dos dosis de nitrógeno y con

Resultados

aplicación de CK (K) o plantas control sin CK (0) en varias fases del crecimiento en los experimentos con trigo de 2006 y 2007. Efecto de la citoquinina (0 vs. K) en el conjunto de las hojas (**a**, **b** y **c**) y niveles del CO₂ (A, E), y separando las distintas hojas, o los tratamientos de CO₂; y efecto del CO₂ (A vs. E) en el conjunto de las hojas y niveles de CK, o en éstos últimos separadamente. Véase materiales y métodos para más detalles sobre este análisis.

Año	Estadio	Contraste	Parámetros de la regresión		
			comunes	g_0 separado	g_0 y g_1 separados
2006	Antesis				
		0 vs K	<.001	0.61	0.17
		A vs E	<.001	0.98	0.036
		0, A vs E	<.001	0.44	0.019
		K, A vs E	<.001	0.53	0.39
2007	Emergencia de la espiga				
		0 vs K	<.001	0.002	0.048
		A, 0 vs K	<.001	0.05	0.35
		E, 0 vs K	<.001	0.012	0.005
		hoja a , 0 vs K	<.001	<.001	0.009
		hoja a & A 0 vs K	<.001	<.001	0.74
		hoja a & E, 0 vs K	<.001	0.007	0.029
		hoja b , 0 vs K	<.001	0.028	0.97
		hoja b & A, 0 vs K	<.001	0.10	0.91
		hoja b & E, 0 vs K	0.007	0.20	0.95
2007	Antesis				
		A vs E	<.001	<.001	0.25
		0, A vs E	<.001	0.002	0.23
		K, A vs E	0.007	0.21	0.93

Después de la antesis - 10 dda -, la aplicación de CK no afectó a la regresión g_s -A·Hr/Ca en ninguna de las hojas del dosel, para ninguna de las dos concentraciones atmosféricas de CO₂ ni dosis de nitrógeno - no mostrado -. En plantas sin CK (0) el CO₂ elevado disminuyó la ordenada en el origen y no modificó la pendiente del modelo de Ball *et al.* (Tabla 4.2.4), de forma que, para valores dados de A·Hr/Ca, el CO₂ elevado disminuyó la g_s de las plantas control sin CK (Fig. 4.2.5 c). En contraste, en plantas con CK, el CO₂ de crecimiento no modificó la regresión y sólo fue significativa una recta común (Tabla 4.2.4, Fig. 4.2.5 c).

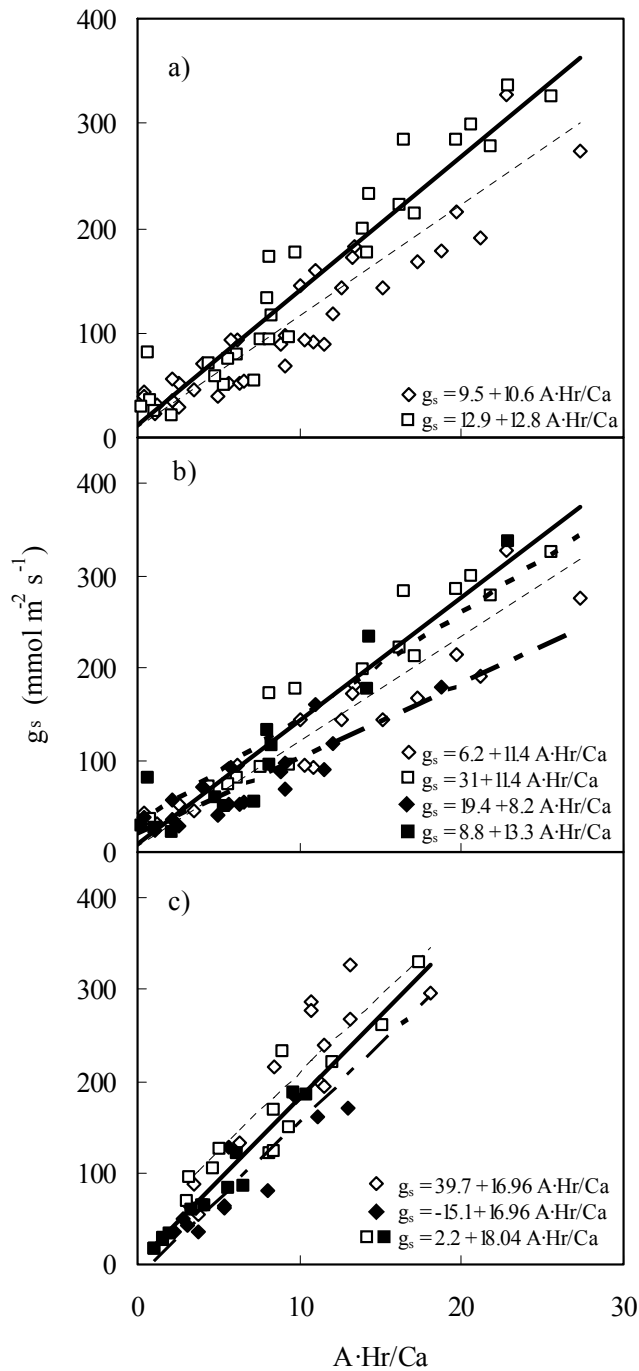


Figura 4.2.5. Efecto de la $[\text{CO}_2]$ y de la adición de CK sobre el modelo de Ball *et al.* (1987) de la conductancia estomática ($g_s = g_0 + g_1 \text{A} \cdot \text{Hr} / \text{Ca}$) del trigo crecido en las TGCs del experimento de 2007 a, b) en las hojas **a**, **b** y **c**, durante la emergencia de la espiga y c) en las hojas **a** y **b** en la antesis. Las medidas se realizaron en iguales condiciones que en 2006 y las regresiones comunes o por separado fueron ajustadas a los tratamientos de acuerdo con el análisis de paralelismo de la Tabla 4.2.4. a) Efecto general de la CK en la emergencia de la espiga bajo las diferentes dosis de nitrógeno y $[\text{CO}_2]$. Rombos abiertos y línea punteada, control sin CK; cuadrados abiertos y línea continua, con CK. En b y c) con CO_2 ambiente (símbolos abiertos) o elevado (símbolos cerrados) y combinado con dos dosis de nitrógeno y la adición (\square , \blacksquare) o no (\diamond , \blacklozenge) de CK. b) Efecto de la CK con las dos $[\text{CO}_2]$ por separado. Línea de puntos finos, control sin CK en CO_2 ambiente; línea de puntos gruesos, con CK en CO_2 ambiente; puntos con líneas, control sin CK con CO_2 alto, línea continua, con CK en CO_2 alto. c) Efecto de la $[\text{CO}_2]$ 10 dda. Línea de puntos finos, control sin CK en CO_2 ambiente; línea de puntos gruesos, control sin CK en CO_2 alto; línea continua, CO_2 ambiente y CO_2 alto, en plantas con CK.

4.2.3.

Respuesta de la Fluorescencia de la clorofila en el año 2007

Diez días antes de la emergencia de la espiga, con medidas de la fluorescencia de la clorofila en CO₂ ambiente e irradiancia de 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el CO₂ elevado disminuyó la eficiencia fotoquímica máxima en el estado adaptado a la luz (Fv':Fm') con suministro bajo de nitrógeno, pero no con suministro alto (Tabla 4.2.5, Fig. 4.2.6). La adición de más nitrógeno aumentó Fv':Fm' en plantas crecidas en CO₂ elevado y no tuvo efecto en CO₂ ambiente. No hubo diferencias en este parámetro entre las tres hojas del dosel (Tabla 4.2.5).

Tabla 4.2.5. Análisis de la varianza - valores de probabilidad, *P* - para el rendimiento cuántico del transporte de electrones (Φ), la eficiencia fotoquímica máxima en la luz (Fv':Fm') y la extinción fotoquímica de la fluorescencia de la clorofila (qP) en las tres últimas hojas del dosel vegetal - hojas **a**, **b** y **c** - del trigo en dos fases del crecimiento en 2007, crecido en las TGCs con CO₂ ambiente (370 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) o elevado (700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$), en los distintos estratos del dosel vegetal (D), dos dosis de nitrógeno (N) y la adición o no de citoquinina (K).

	Emergencia de la espiga			Antesis		
	Φ	Fv':Fm'	qP	Φ	Fv':Fm'	qP
CO ₂ (C)	0.066	0.05	0.51	0.38	0.048	0.17
Citoquinina (K)	0.61	0.34	0.85	0.29	0.91	0.26
Nitrógeno (N)	0.42	0.003	0.014	0.25	0.004	0.90
Dosel (D)	<.001	0.12	<.001	<.001	0.006	<.001
C.K	0.50	0.63	0.66	0.86	0.24	0.63
C.N	0.41	0.008	0.017	0.31	0.13	0.63
K.N	0.78	0.12	0.59	0.18	0.51	0.25
C.D	0.57	0.11	0.27	0.028	0.15	0.001
K.D	0.062	0.60	0.61	0.70	0.85	0.84
N.D	0.90	0.76	0.87	0.11	0.67	0.11
C.K.N	0.96	0.67	0.74	0.68	0.89	0.79
C.K.D	0.16	0.84	0.18	0.25	0.84	0.28
C.N.D	0.07	0.92	0.04	0.35	0.301	0.42
N.K.D	0.92	0.57	0.87	0.42	0.31	0.28
C.K.N.D	0.99	0.75	0.86	0.52	0.23	0.66

La interacción del CO₂ y el nitrógeno sobre qP fue la inversa de la observada sobre Fv':Fm', pues el CO₂ elevado disminuyó qP con nitrógeno alto, pero no con nitrógeno bajo (Fig. 4.2.6). El nitrógeno disminuyó qP en plantas de CO₂ elevado y no tuvo efecto en las de CO₂ ambiente. Generalmente, qP disminuyó al descender en el dosel, aunque tuvo un valor similar en las hojas **a** y **b** de plantas en CO₂ elevado y nitrógeno bajo. Como resultado de los efectos descritos, el CO₂ elevado disminuyó el rendimiento cuántico del transporte de e⁻ (Φ) en las tres hojas de plantas con nitrógeno alto, pero sólo en la hoja **a** de las plantas con

nitrógeno bajo (Fig. 4.2.6). La adición de este nutriente aumentó Φ en la hoja **b** de las plantas en CO₂ ambiente y lo disminuyó en estas mismas hojas en CO₂ elevado. Este parámetro disminuyó progresivamente al descender en el dosel (Fig. 4.2.6).

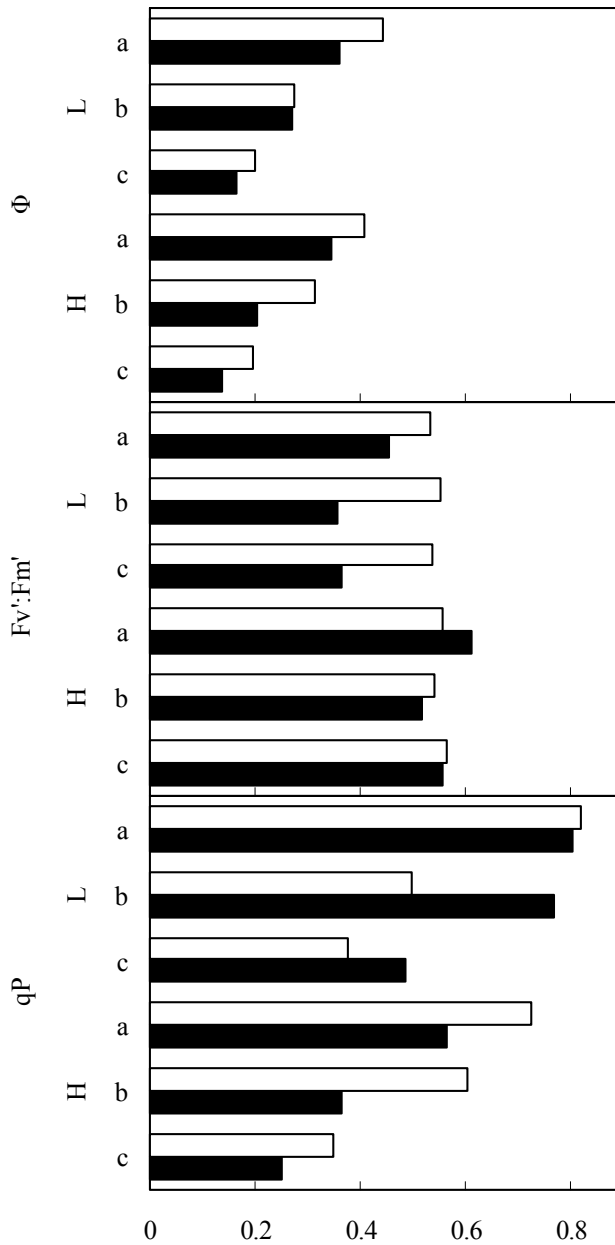


Figura 4.2.6. Efectos del CO₂ - A, 370 $\mu\text{mol mol}^{-1}$; E, 700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ - y el nitrógeno - L, dosis baja; H, dosis alta -, sobre el rendimiento cuántico del transporte de e⁻ (Φ), la eficiencia fotoquímica máxima en la luz (Fv':Fm') y la extinción fotoquímica de la fluorescencia de la clorofila (qP) en las tres últimas hojas del dosel vegetal - a, b y c -, medidas diez días antes de la emergencia de la espiga en el experimento con trigo en las TGCs del año 2007.

El único efecto de la CK en los parámetros de la fluorescencia fue

una disminución de Φ en la hoja **a**; ya que ni la disminución de Fv':Fm' y qP en la hoja **a**, ni el aumento de qP en la hoja **b** debidos a la CK alcanzaron significación estadística (Tabla 4.2.5, Fig. 4.2.7).

Resultados

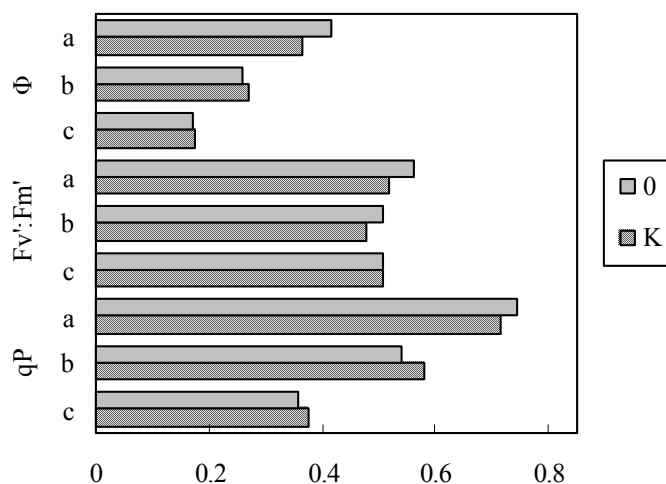


Figura 4.2.7. Efecto de la adición de citoquinina (K) frente al control sin CK (0), sobre el rendimiento cuántico del transporte de e^- (Φ), eficiencia fotoquímica máxima en la luz (Fv':Fm') y la extinción fotoquímica de la fluorescencia de la clorofila (qP), en las tres últimas hojas del dosel vegetal - a, b y c - diez días antes de la emergencia de la espiga del experimento del año 2007.

Diez días después de la antesis, el CO_2 elevado disminuyó y la adición de más nitrógeno aumentó Fv':Fm' (Tabla 4.2.5, Fig. 4.2.8 a). Los efectos principales de estos factores sobre Φ y qP no fueron significativos aunque sí disminuyeron al descender posiciones en el dosel vegetal, pero esta disminución fue menos acusada en CO_2 elevado que ambiente (Fig. 4.2.8 b). Fv':Fm', en cambio, disminuyó del mismo modo con ambas concentraciones de CO_2 (Fig. 4.2.8 b).

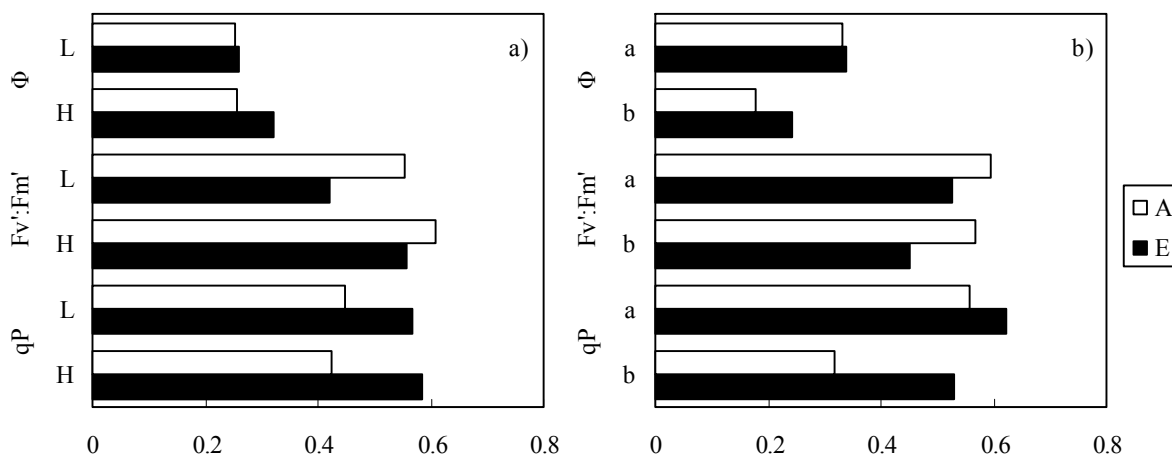


Figura 4.2.8. Efecto de la concentración de CO_2 durante el crecimiento - A, 370 $\mu mol mol^{-1}$; E, 700 $\mu mol mol^{-1}$ -, en interacción con a) el nitrógeno - L, dosis baja; H, dosis alta - y b) la posición de la hoja en el dosel vegetal - hojas a y b -, en el rendimiento cuántico del transporte de e^- (Φ), la eficiencia fotoquímica máxima en la luz (Fv':Fm') y la extinción fotoquímica de la fluorescencia de la clorofila (qP), diez días después de la antesis del experimento con trigo en las TGCs del año 2007.

4.2.4.

Contenidos de clorofila

4.2.4.1 Experimento de 2006

Tres días después de la antesis, el CO₂ elevado redujo los contenidos de clorofila total (Chl a+b) y de clorofila a (Chl a) en base al peso fresco foliar de la hoja **c**, la CK redujo ambos parámetros en la hoja **a** y aumentó la Chl a en la hoja **c** - con escasa significación en el caso de los niveles de Chl a+b en la hoja **a** y del aumento de Chl a en la hoja **c** - y la mayor dosis de nitrógeno incrementó estos parámetros en los tres niveles foliares (Tabla 4.2.6). Si la Chl a+b se expresa en base al área foliar, el comportamiento fue muy similar al que hubo en la Chl a por peso, encontrando una reducción producida por CK en la hoja **a** (Tabla 4.2.6). En la hoja **b** hubo un descenso debido al crecimiento en CO₂ elevado, que sólo ocurrió si las plantas recibían CK (Fig. 4.2.9 b); y alcanzó significación el aumento debido al mayor aporte de nitrógeno en los tres estratos foliares (Tabla 4.2.6).

Los contenidos de clorofila b (Chl b) expresados en base al peso y en base al área no fueron afectados por el CO₂ de crecimiento ni la aspersion con CK, sin embargo sí mostraron aumentos debidos al aporte abundante de nitrógeno en los tres niveles de hojas, siendo significativo en las hojas **b** y **c** (Tabla 4.2.6). El cociente entre Chl a y b (Chl a:b) no se vio afectado por ningún tratamiento en ningún estrato del dosel - no mostrado -.

Resultados

Tabla 4.2.6. Contenidos de clorofila total (Chl a+b), de clorofila a (Chl a) y clorofila b (Chl b) expresados en base al peso fresco (mg g^{-1}) y en base al área foliar (g m^{-2}) durante la antesis del experimento del año 2006, en los últimos estratos del dosel vegetal - hojas **a**, **b** y **c** -, con CO_2 ambiente (A) o elevado (E), sin (0) o con aspersión de citoquinina (K) y adición baja (L) o alta (H) de nitrógeno. *P* es la probabilidad del análisis de la varianza para cada factor y las interacciones simples entre el CO_2 y la citoquinina (C.K), el CO_2 y el nitrógeno (C.N) y la citoquinina y el nitrógeno (K.N).

		CO_2			Citoquinina			Nitrógeno			<i>Interacciones(P)</i>		
		A	E	<i>P</i>	0	K	<i>P</i>	L	H	<i>P</i>	C.K	C.N	K.N
3 días después de antesis													
Chl a+b (mg g^{-1})	hoja a	3.37	3.38	ns	3.59	3.16	0.08	3.12	3.63	0.05	ns	ns	ns
	hoja b	2.72	2.59	ns	2.76	2.55	ns	2.36	2.95	0.01	ns	ns	ns
	hoja c	2.11	1.75	0.01	1.819	2.04	ns	1.76	2.10	0.04	ns	ns	ns
Chl a+b (g m^{-2})	hoja a	0.613	0.638	ns	0.671	0.580	0.06	0.576	0.675	0.04	ns	ns	ns
	hoja b	0.587	0.533	0.09	0.575	0.544	ns	0.480	0.640	0.01	0.07	ns	ns
	hoja c	0.440	0.409	ns	0.396	0.452	ns	0.379	0.469	0.06	ns	ns	ns
Chl a (mg g^{-1})	hoja a	2.37	2.34	ns	2.49	2.23	0.04	2.22	2.49	0.04	ns	ns	ns
	hoja b	1.88	1.81	ns	1.93	1.76	ns	1.63	2.06	0.01	ns	ns	ns
	hoja c	1.43	1.18	0.03	1.22	1.40	0.08	1.20	1.41	0.06	ns	ns	ns
Chl a (g m^{-2})	hoja a	0.431	0.442	ns	0.465	0.408	0.05	0.408	0.465	0.05	ns	ns	ns
	hoja b	0.405	0.373	0.06	0.402	0.376	ns	0.331	0.446	0.01	0.07	ns	ns
	hoja c	0.300	0.276	ns	0.265	0.311	ns	0.262	0.315	ns	ns	ns	ns
Chl b (mg g^{-1})	hoja a	1.01	1.04	ns	1.104	0.935	ns	0.904	1.135	0.08	ns	ns	ns
	hoja b	0.843	0.781	ns	0.833	0.792	ns	0.729	0.895	0.04	ns	ns	ns
	hoja c	0.677	0.567	0.09	0.605	0.639	ns	0.550	0.694	0.05	ns	ns	ns
Chl b (g m^{-2})	hoja a	0.182	0.196	ns	0.206	0.172	ns	0.168	0.211	0.07	ns	ns	ns
	hoja b	0.182	0.160	ns	0.174	0.168	ns	0.149	0.194	0.03	ns	ns	ns
	hoja c	0.139	0.132	ns	0.131	0.140	ns	0.117	0.154	0.03	ns	ns	ns

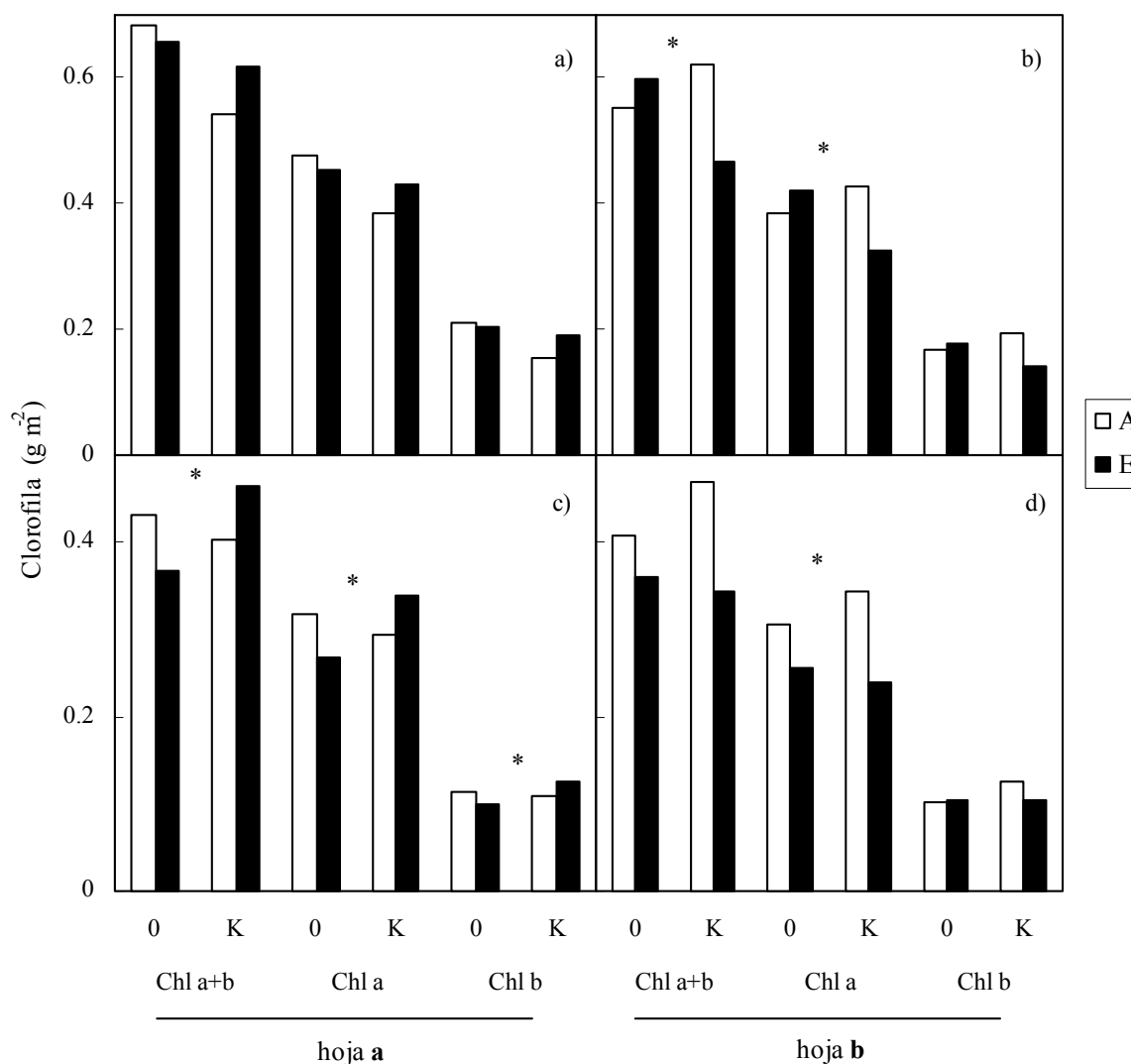


Figura 4.2.9. Interacciones CO₂ x citoquinina sobre el contenido de clorofila total (Chl a+b), de clorofila a (Chl a) y clorofila b (Chl b) expresados en base al área foliar (g m⁻²) en plantas crecidas en CO₂ ambiente (A) o elevado (E) y sin (0) o con aspersión de citoquinina (K), medidas en las hojas **a** (a, c) y **b** (b, d) durante la antesis del trigo en el experimento del año 2006 (a, b) y la emergencia de la espiga en el experimento del año 2007 (c, d). Los asteriscos representan diferencias significativas.

4.2.4.2 Experimento de 2007

Diez días antes de la emergencia de la espiga el CO₂ elevado alteró los contenidos de Chl a+b, Chl a y b por unidad de peso fresco y por unidad de superficie foliar similarmente, aunque la significación estadística varió dependiendo de la hoja analizada (Tabla 4.2.7). En la hoja **a** (Fig. 4.2.10 a) el CO₂ elevado aumentó estos contenidos con la mayor dosis de nitrógeno y los disminuyó con la dosis menor - efecto significativo para contenidos por unidad de superficie -. En la hoja **b** (Fig. 4.2.10 b) los contenidos de Chl a+b y Chl a disminuyeron con el CO₂ elevado y la dosis alta de nitrógeno - efecto significativo para

Resultados

contenidos por unidad de peso fresco y, para la Chl a, también por unidad de superficie -; el contenido de Chl b mostró la misma tendencia.

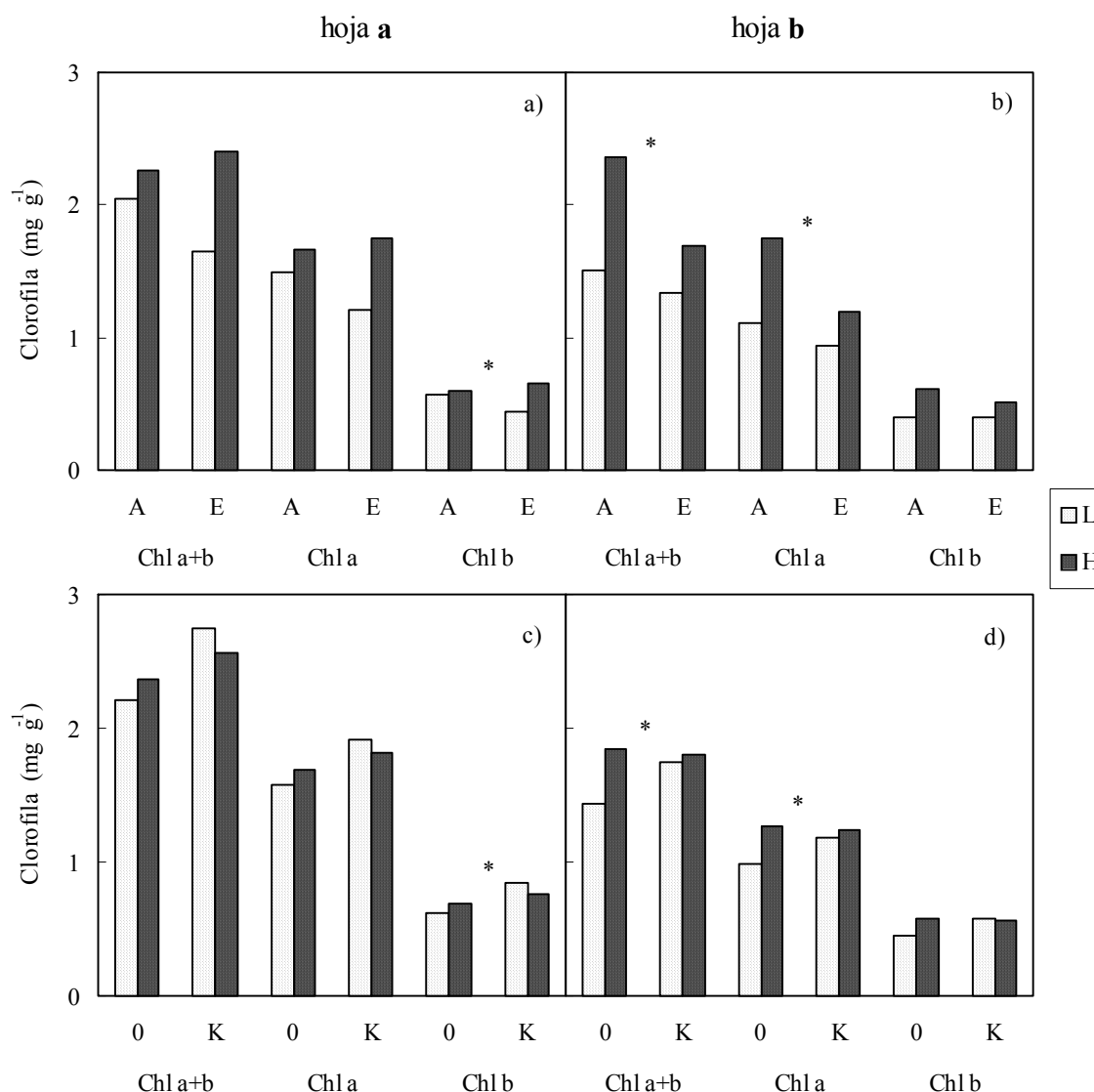


Figura 4.2.10. Interacciones CO₂ x nitrógeno diez días antes de la emergencia de la espiga (a, b) y CK x nitrógeno diez días después de la antesis del trigo (c, d) sobre el contenido de clorofila total (Chl a+b), de clorofila a (Chl a) y clorofila b (Chl b) expresados en base al peso fresco (mg g⁻¹) de las hojas **a** (a, c) y **b** (b, d) en plantas crecidas en CO₂ ambiente (A) o elevado (E), sin (0) o con aspersión de citoquinina (K) y adición baja (L) o alta (H) de nitrógeno, en el experimento del año 2007. Los asteriscos representan diferencias significativas.

En la hoja **c** la disminución de los contenidos de clorofilas por unidad de peso fresco con el CO₂ elevado fue significativa con las dos dosis de nitrógeno. La [CO₂] tuvo efectos diferentes sobre los contenidos de clorofila en las plantas con y sin CK. En la hoja **a** el CO₂ elevado disminuyó los niveles de Chl a+b y de Chl a por unidad de superficie foliar en las plantas sin CK, pero los aumentó en presencia de CK (Fig. 4.2.9 c). En la hoja **b**, en cambio,

el CO₂ elevado no modificó significativamente el nivel de Chl **a** por unidad de superficie en plantas sin CK, pero disminuyó este nivel en plantas con aplicación de CK (Fig. 4.2.9 d); el CO₂ elevado tendió a tener el mismo efecto interactivo con la CK sobre la Chl a+b, aunque no alcanzó significación estadística.

La dosis abundante de nitrógeno tuvo, en general, un efecto positivo significativo en los contenidos de Chl a+b, Chl a y Chl b por unidad de peso y de superficie en los tres grupos de hojas (Tabla 4.2.7; Fig. 4.2.10 a, b). No obstante, en la hoja **a** este efecto del nitrógeno en la Chl a+b - por unidad de superficie foliar - y en la Chl b - por unidad de superficie y por peso fresco - sólo fue significativo en CO₂ alto (Fig. 4.2.10 a).

En la hoja **a** la aplicación de CK no tuvo efecto en los contenidos de Chl a+b y Chl a por unidad de superficie en plantas que crecieron en CO₂ ambiente, pero aumentó estos contenidos en CO₂ elevado (Fig. 4.2.9 c). La CK no tuvo efectos significativos en las clorofilas de otras hojas (Tabla 4.2.7).

Al crecer con el doble de CO₂ se modificó la razón Chl a:b, aumentando en la hoja **c** y disminuyendo en la hoja **b**. El empleo de CK y de distintas dosis de nitrógeno no mostró efectos sobre los cocientes Chl a:b en ningún estrato foliar, excepto un descenso en la hoja **c** cercano a la significación debido al mayor aporte de fertilizante nitrogenado (Tabla 4.2.7).

Resultados

Tabla 4.2.7. Contenidos de clorofila total (Chl a+b), de clorofila a (Chl a) y clorofila b (Chl b) expresados en base al peso fresco (mg g^{-1}) y al área foliar (g m^{-2}), de los distintos estratos del dosel vegetal - hojas **a**, **b** y **c** -, en dos fases del crecimiento del trigo en el experimento del año 2007, con CO_2 ambiente (A) o elevado (E), sin (0) o con aspersión de citoquinina (K) y adición baja (L) o alta (H) de nitrógeno. *P* es la probabilidad del análisis de la varianza para cada factor y las interacciones simples entre el CO_2 y la citoquinina (C.K), el CO_2 y el nitrógeno (C.N) y la citoquinina y el nitrógeno (K.N).

		CO ₂			Citoquinina			Nitrógeno			Interacciones(<i>P</i>)		
		A	E	<i>P</i>	0	K	<i>P</i>	L	H	<i>P</i>	C.K	C.N	K.N
Emergencia espiga													
Chl a+b (mg g^{-1})	hoja a	2.16	2.02	ns	2.01	2.18	ns	1.85	2.33	0.03	ns	ns	ns
	hoja b	1.94	1.52	ns	1.69	1.77	ns	1.42	2.03	<.001	ns	0.05	ns
	hoja c	2.10	1.74	0.02	1.92	1.92	ns	1.66	2.18	0.03	ns	ns	ns
Chl a+b (g m^{-2})	hoja a	0.417	0.416	ns	0.399	0.434	ns	0.352	0.481	0.01	0.04	0.05	ns
	hoja b	0.439	0.352	ns	0.384	0.407	ns	0.326	0.465	<.001	0.09	ns	ns
	hoja c	0.459	0.358	ns	0.431	0.385	ns	0.342	0.474	0.01	ns	ns	ns
Chl a (mg g^{-1})	hoja a	1.58	1.48	ns	1.05	1.59	ns	1.35	1.71	0.03	ns	ns	ns
	hoja b	1.43	1.07	0.09	1.23	1.27	ns	1.03	1.47	<.001	ns	0.02	ns
	hoja c	1.38	1.18	0.03	1.29	1.28	ns	1.12	1.45	0.04	ns	ns	ns
Chl a (g m^{-2})	hoja a	0.305	0.303	ns	0.292	0.316	ns	0.257	0.352	0.01	0.04	0.07	ns
	hoja b	0.324	0.248	0.08	0.281	0.291	ns	0.235	0.337	<.001	0.07	0.06	ns
	hoja c	0.303	0.243	ns	0.290	0.256	ns	0.230	0.315	0.02	ns	ns	ns
Chl b (mg g^{-1})	hoja a	0.584	0.547	ns	0.540	0.592	ns	0.504	0.628	0.01	ns	0.03	ns
	hoja b	0.506	0.448	ns	0.455	0.500	ns	0.398	0.556	0.01	ns	ns	ns
	hoja c	0.714	0.560	0.02	0.630	0.644	ns	0.544	0.730	0.02	ns	ns	ns
Chl b (g m^{-2})	hoja a	0.112	0.113	ns	0.107	0.118	ns	0.0952	0.129	0.01	0.05	0.02	ns
	hoja b	0.115	0.104	ns	0.103	0.115	ns	0.0910	0.128	0.01	ns	ns	ns
	hoja c	0.156	0.115	ns	0.142	0.129	ns	0.112	0.159	0.01	ns	ns	ns
Chl a:b	hoja a	2.72	2.72	ns	2.73	2.7	ns	2.71	2.72	ns	ns	ns	ns
	hoja b	2.88	2.43	0.06	2.74	2.57	ns	2.64	2.67	ns	ns	ns	ns
	hoja c	1.93	2.14	0.06	2.05	2.02	ns	2.09	1.98	0.08	ns	0.09	ns

Tabla 4.2.7 (Continuación)

		CO ₂			Citoquinina			Nitrógeno			<i>Interacciones(P)</i>		
		A	E	P	0	K	P	L	H	P	C.K	C.N	K.N
10 días después de antesis													
Chl a+b (mg g ⁻¹)	hoja a	2.66	2.29	ns	2.29	2.66	0.01	2.48	2.47	ns	ns	ns	ns
	hoja b	1.99	1.43	0.03	1.64	1.77	ns	1.60	1.82	0.03	ns	ns	0.06
Chl a+b (g m ⁻²)	hoja a	0.561	0.502	ns	0.516	0.546	ns	0.523	0.539	ns	ns	ns	ns
	hoja b	0.421	0.323	0.04	0.358	0.386	ns	0.351	0.394	ns	ns	ns	ns
Chl a (mg g ⁻¹)	hoja a	1.86	1.64	ns	1.63	1.86	0.01	1.75	1.75	ns	ns	ns	ns
	hoja b	1.35	0.99	0.04	1.13	1.21	ns	1.08	1.25	0.01	ns	0.04	0.07
Chl a (g m ⁻²)	hoja a	0.392	0.360	ns	0.369	0.383	ns	0.369	0.383	ns	ns	ns	ns
	hoja b	0.286	0.223	0.05	0.246	0.263	ns	0.238	0.271	0.07	ns	ns	ns
Chl b (mg g ⁻¹)	hoja a	0.800	0.652	ns	0.655	0.796	<.001	0.733	0.719	ns	ns	ns	0.02
	hoja b	0.638	0.445	0.01	0.516	0.567	ns	0.515	0.569	ns	ns	ns	ns
Chl b (g m ⁻²)	hoja a	0.168	0.142	0.08	0.147	0.164	0.07	0.154	0.157	ns	ns	ns	ns
	hoja b	0.136	0.101	0.04	0.113	0.124	ns	0.113	0.123	ns	ns	ns	ns
Chl a:b	hoja a	2.33	2.56	0.07	2.53	2.35	0.05	2.43	2.46	ns	ns	ns	ns
	hoja b	2.12	2.26	ns	2.23	2.16	ns	2.17	2.21	ns	ns	0.04	ns

En la muestra tomada diez días después de la antesis, en la hoja **b** el CO₂ elevado disminuyó de forma significativa todos los contenidos de clorofila ya fueran calculados en base al peso o en base al área e independientemente de la dosis de nitrógeno (Tabla 4.2.7). El CO₂ elevado aumentó el cociente Chl a:b en la hoja **a** y, con aporte bajo de nitrógeno, en la hoja **b** - interacción no mostrada -. En la hoja **b** el aumento de Chl a en base al peso fresco conseguido con nitrógeno abundante, solo fue significativo con CO₂ ambiente - no mostrado -. Un aporte abundante de nitrógeno aumentó los contenidos de Chl a+b y de Chl a por unidad de peso fresco de la hoja **b** sólo en plantas sin CK (Fig. 4.2.10 d) y se acercó a la significación un incremento en la Chl a por área de la hoja **b**; los contenidos de Chl b por unidad de peso fresco de la hoja **a** se redujeron por la adición de más nitrógeno en presencia de CK (Fig. 4.2.10 c).

La adición de CK aumentó la Chl a+b, Chl a y Chl b por unidad de peso fresco en la hoja **a** y, con dosis baja de nitrógeno, la Chl a+b y Chl a por peso fresco en la hoja **b** (Tabla 4.2.7, Fig. 4.2.10 c, d). En cuanto a la Chl b en base al área, la CK generó aumentos en la hoja **a** y también redujo el cociente Chl a:b de dicho estrato foliar (Tabla 4.2.7).

4.2.5. Contenidos de proteína soluble y Rubisco

4.2.5.1 Experimento de 2006

Tres días después de la antesis, el CO₂ elevado disminuyó el contenido de proteína soluble por unidad de peso fresco (Prot/p) de las tres hojas del dosel analizadas (Tabla 4.2.8) y de la hoja **a** cuando se expresó por área (Prot/A) y las plantas recibieron la mayor dosis de nitrógeno- no mostrado -. La adición de más nitrógeno aumentó la Prot/p de las tres hojas y de las hojas **b** y **c** si los resultados se expresaron en base al área (Tabla 4.2.8), aunque en la hoja **a** este efecto sólo fue significativo con CO₂ ambiente y en la hoja **c** en plantas que recibieron CK (Fig. 4.2.11 a). La aspersion con CK no tuvo efecto en la hoja **a**, mientras que en las hojas **b** y **c** tuvo globalmente un efecto positivo en el contenido de proteína soluble por peso fresco y por área (Tabla 4.2.8). La interacción CO₂ x CK fue significativa en la hoja **c**, implicando que la hormona aumentó la proteína en CO₂ ambiente, pero no en CO₂ elevado (Fig. 4.2.11 b), y el aumento debido a la CK sólo fue significativo en plantas con nitrógeno abundante (Fig. 4.2.11 a).

Se observó también una disminución con el CO₂ elevado de la proteína Rubisco por peso fresco (Rbco/p) y por superficie foliar (Rbco/A) en la hoja **c**, que sólo alcanzó significación estadística en plantas con aplicación de CK (Fig. 4.2.11 b) y también cuando la dosis de fertilizante nitrogenado fue mayor (Fig. 4.2.12 a). La adición de más nitrógeno aumentó la proteína Rubisco en todos los estratos del dosel (Tabla 4.2.8, Fig. 4.2.12 a). La significación de este efecto fue débil en la hoja **a** (P=0.081) y sólo ocurrió con Rbco/p (Tabla 4.2.8). Además, la aplicación de nitrógeno abundante aumentó la proteína Rubisco de la hoja **c** en mayor medida con aspersion de CK que sin ella - de la misma manera que ocurrió con la prot/A en este estrato del dosel -.

La CK disminuyó la proteína Rubisco por peso fresco y área foliar en la hoja **a** (Tabla 4.2.8). En la hoja **b** la CK tendió a tener el efecto contrario, aunque no fue significativo. En la hoja **c** la CK aumentó la proteína Rubisco en CO₂ ambiente, pero en CO₂ elevado la disminuyó (Fig. 4.2.11 b). En esta hoja, la CK aumentó la Rbco/p con nitrógeno abundante, pero no con nitrógeno bajo. La fracción de Rubisco en la proteína soluble (% Rubisco) no cambió significativamente con el CO₂ elevado en ninguna de las tres hojas superiores del dosel vegetal. El nitrógeno en dosis alta aumentó el % Rubisco de las hojas **b** y **c** y no alteró esta proporción en la hoja **a**. La aspersion con CK disminuyó el % Rubisco en todas las hojas (Tabla 4.2.8).

Tabla 4.2.8 Contenido de proteína soluble y Rubisco en el experimento de trigo del año 2006 crecido con CO₂ ambiente (A) o elevado (E), sin (0) o con aspersión de citoquinina (K) y adición baja (L) o alta (H) de nitrógeno. *P* es la probabilidad del análisis de la varianza para cada factor y las interacciones simples entre el CO₂ y la citoquinina (C.K), el CO₂ y el nitrógeno (C.N) y la citoquinina y el nitrógeno (K.N).

		<u>CO₂</u>		<i>P</i>	<u>Citoquinina</u>		<i>P</i>	<u>Nitrógeno</u>		<i>P</i>	<u>Interacciones(<i>P</i>)</u>		
		A	E		0	K		L	H		C.K	C.N	K.N
3 días después de antesis													
Prot/p (mg g ⁻¹)	hoja a	33.9	28.9	0.04	32.2	30.6	ns	29.9	32.9	0.01	ns	ns	ns
	hoja b	20.8	18.1	0.06	17.9	21.1	0.03	17.4	21.5	0.01	ns	ns	ns
	hoja c	13.9	10.6	0.01	11.3	13.2	0.01	10.9	13.6	<.001	0.03	ns	0.03
Prot/A (g m ⁻²)	hoja a	6.17	5.42	ns	6.04	5.55	ns	5.60	6.00	ns	ns	0.06	ns
	hoja b	4.57	3.93	ns	3.74	4.75	0.07	3.74	4.76	0.07	ns	ns	ns
	hoja c	2.91	2.49	ns	2.48	2.93	0.02	2.38	3.03	0.002	ns	ns	0.01
Rbco/p (nmol g ⁻¹)	hoja a	56.1	44.3	ns	53.4	47.1	0.05	47.4	53.1	0.08	ns	ns	ns
	hoja b	32.8	25.6	ns	27.9	30.4	ns	25.3	33.0	0.01	ns	ns	ns
	hoja c	18.6	13.6	0.06	15.7	16.6	ns	13.7	18.6	<.001	<.001	0.06	0.01
Rbco/A (μmol m ⁻²)	hoja a	10.2	8.23	0.09	10.2	8.45	0.05	8.75	9.73	ns	ns	ns	ns
	hoja b	7.15	5.56	ns	5.83	6.88	ns	5.46	7.25	0.04	ns	ns	ns
	hoja c	4.01	2.94	0.01	3.27	3.68	ns	2.89	4.07	<.001	0.003	ns	ns
% Rubisco (% en prot.)	hoja a	80.5	76.6	ns	82.5	74.7	0.07	77.3	79.8	ns	ns	ns	ns
	hoja b	78.6	68.3	ns	76.9	70.0	0.03	69.6	77.2	0.02	ns	ns	ns
	hoja c	67.2	64.9	ns	72.3	59.8	<.001	62.3	69.8	0.02	ns	ns	ns

Resultados

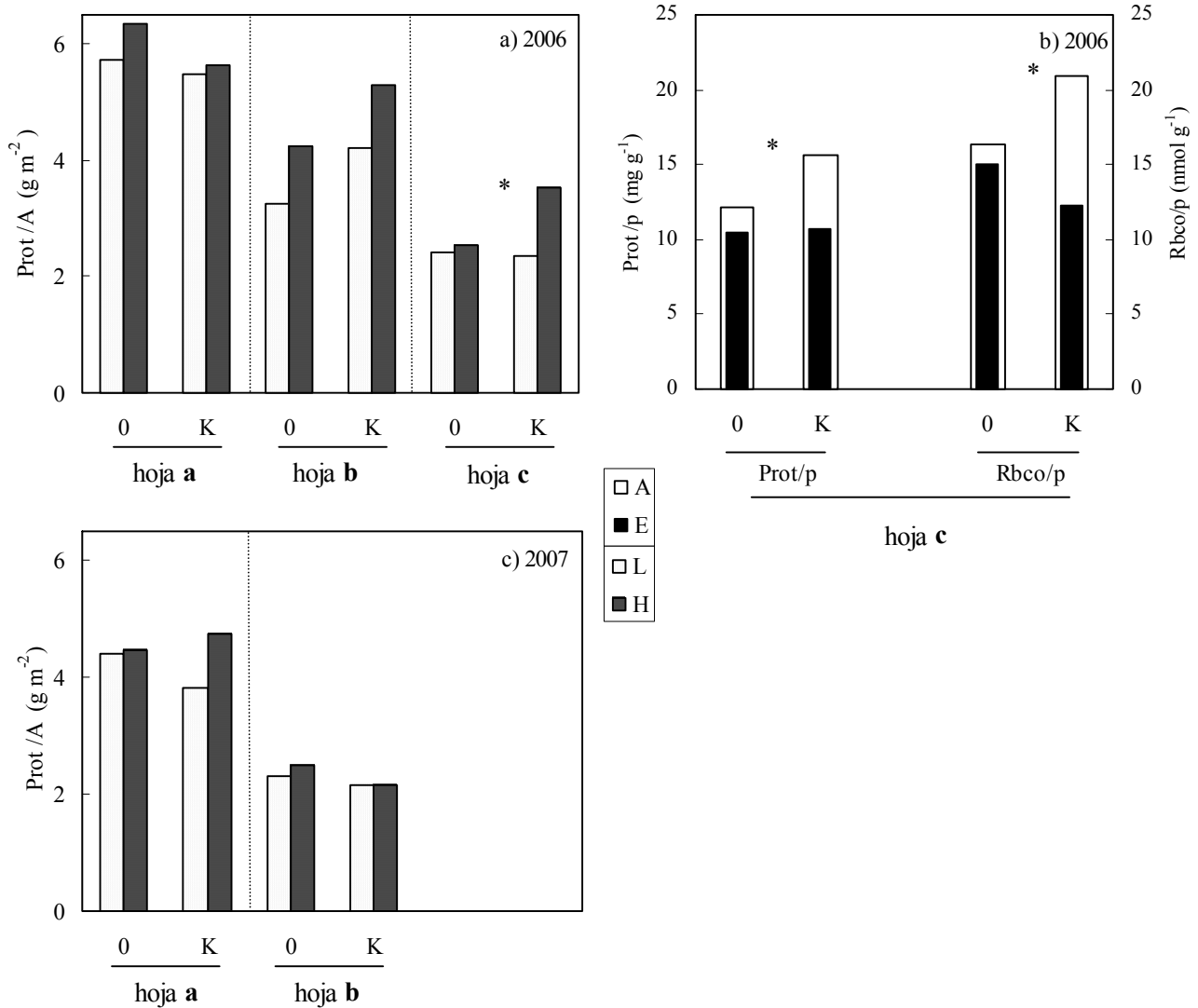


Figura 4.2.11 Contenido de proteína soluble por unidad de superficie foliar (Prot/A) o por peso (Prot/p) y contenidos de Rubisco en base al peso (Rbco/p) en diferentes estratos del dosel vegetal de los experimentos con trigo crecido con CO₂ ambiente (A) o elevado (E), sin (0) o con aspersión de citoquinina (K) y adición baja (L) o alta (H) de nitrógeno. Interacciones CK x nitrógeno en los estratos foliares (a, c) o CO₂ x CK en la hoja c (b) encontradas a,b) tres días después de anthesis - 3 dda - del 2006 y c) 10 dda en las hojas a y b del año 2007. Los asteriscos señalan diferencias significativas.

4.2.5.2 Experimento de 2007

Diez días antes de la emergencia de la espiga el CO₂ elevado disminuyó la proteína en las tres hojas superiores del dosel. Este efecto alcanzó significación cuando la proteína se expresó por unidad de peso fresco - hojas **a** y **c** - o sólo por unidad de superficie - hoja **b** - (Tabla 4.2.9). En la hoja inferior de las analizadas, la disminución de la Prot/p debido al CO₂ elevado ocurrió con nitrógeno abundante, pero no con nitrógeno deficiente (P=0.082). La aplicación de más nitrógeno aumentó la Prot/p en las hojas **b** y **c** y de Prot/A en las tres hojas (Tabla 4.2.9), aunque en la hoja **c** el aumento de Prot/A sólo fue significativo con CO₂ ambiente - no mostrado -. La aspersion con CK sólo produjo un efecto significativo sobre la proteína soluble de la hoja **b**, en la que disminuyó el contenido de ésta por unidad de peso fresco y de superficie foliar (Tabla 4.2.9).

El CO₂ elevado disminuyó el contenido de proteína Rubisco, por peso fresco y superficie foliar, de las dos hojas superiores y no de la hoja **c** (Tabla 4.2.9). En la hoja **b** la disminución del contenido de Rbco/p con el CO₂ elevado se observó en plantas provistas con nitrógeno abundante (Fig. 4.2.12 b). La aplicación de la mayor dosis de nitrógeno no tuvo efecto en el contenido de Rubisco en la hoja **a** y aumentó este contenido por peso fresco y por superficie en las hojas **b** y **c** (Tabla 4.2.9, Fig. 4.2.12 b). El empleo de CK tuvo el mismo efecto en la proteína Rubisco que en la proteína soluble, disminuyéndola en la hoja **b** y no en las otras dos hojas analizadas (Tabla 4.2.9). Tanto el crecimiento con CO₂ elevado, como la adición de CK redujeron en general el % Rubisco, aunque no fue significativo. Sólo la adición de más nitrógeno aumentó el % Rubisco en las hojas **b** y **c**, pero no en la hoja **a** (Tabla 4.2.9).

Resultados

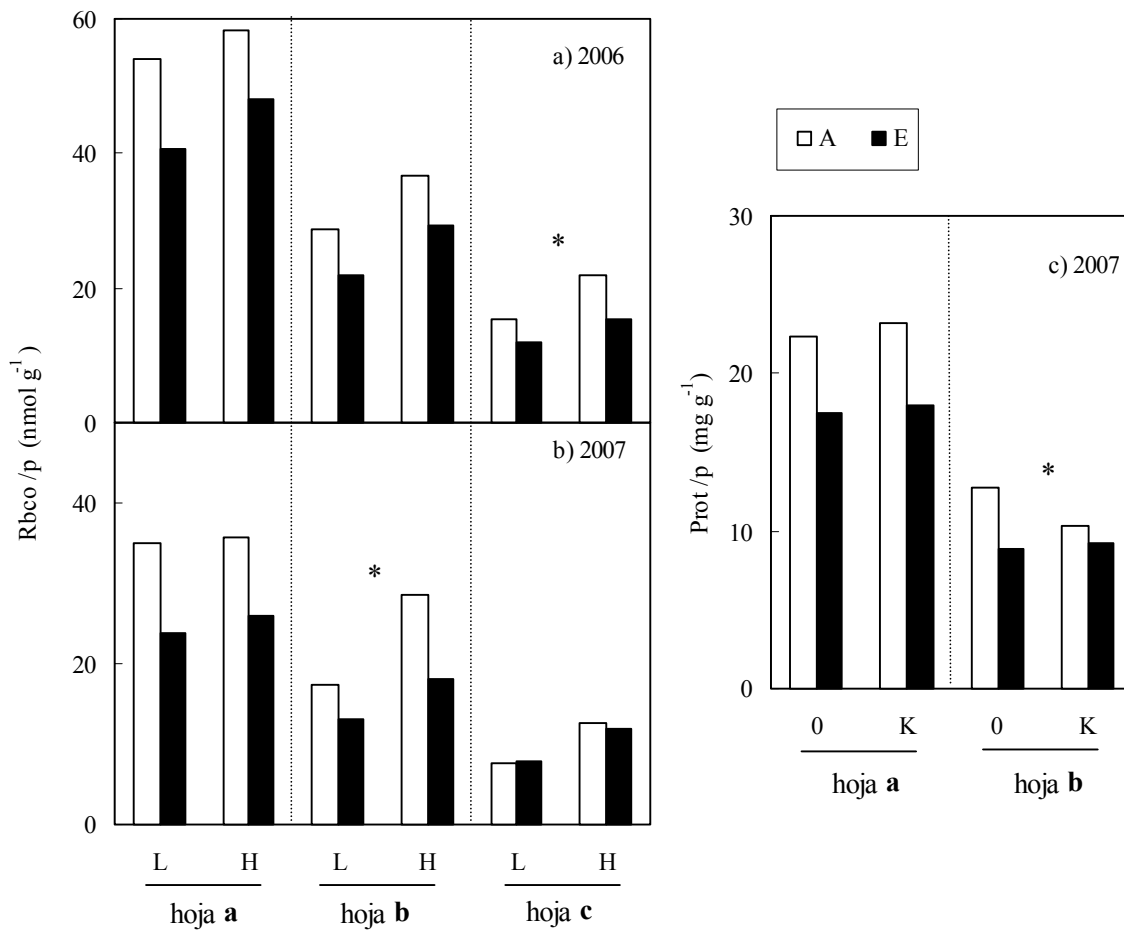


Figura 4.2.12 Interacciones sobre el contenido de proteína soluble (Prot/p) y de la enzima Rubisco (Rbco/p) por unidad de peso fresco en las hojas **a**, **b** y **c** de plantas de trigo crecidas en TGCs con CO₂ ambiente (A) o elevado (E), sin (0) o con aspersión de citoquinina (K) y adición baja (L) o alta (H) de nitrógeno a) 3 dda en 2006, b) durante la emergencia de la espiga en 2007 y c) 10 dda del 2007. Los asteriscos representan diferencias significativas.

Tabla 4.2.9 Contenido de proteína soluble y Rubisco en dos fases del crecimiento del trigo crecido con CO₂ ambiente (A) o elevado (E), sin (0) o con aspersión de citoquinina (K) y adición baja (L) o alta (H) de nitrógeno en el experimento del año 2007. *P* es la probabilidad del análisis de la varianza para cada factor y las interacciones simples entre el CO₂ y la citoquinina (C.K), el CO₂ y el nitrógeno (C.N) y la citoquinina y el nitrógeno (K.N).

		CO ₂			Citoquinina			Nitrógeno			<i>Interacciones(P)</i>		
		A	E	<i>P</i>	0	K	<i>P</i>	L	H	<i>P</i>	C.K	C.N	K.N
Emergencia espiga													
Prot/p (mg g ⁻¹)	hoja a	26.9	21.6	0.01	24.7	23.8	ns	23.1	25.4	ns	ns	ns	ns
	hoja b	19.2	16.8	ns	19.4	16.6	0.03	15.2	20.8	<.001	ns	ns	ns
	hoja c	11.6	9.79	0.07	10.3	11.1	ns	9.15	12.3	<.001	ns	0.08	ns
Prot/A (g m ⁻²)	hoja a	5.17	4.41	0.09	4.89	4.69	ns	4.39	5.19	0.03	ns	ns	ns
	hoja b	4.42	3.92	0.07	4.49	3.83	0.04	3.45	4.88	<.001	ns	ns	ns
	hoja c	2.51	2.11	ns	2.33	2.29	ns	1.95	2.67	<.001	ns	0.03	ns
Rbco/p (nmol g ⁻¹)	hoja a	35.4	24.8	0.01	31.1	29.1	ns	29.4	30.8	ns	ns	ns	ns
	hoja b	22.9	15.6	0.09	20.7	17.8	0.06	15.2	23.3	<.001	ns	0.05	ns
	hoja c	10.2	9.84	ns	10.3	9.66	ns	7.72	12.3	<.001	ns	ns	ns
Rbco/A (μmol m ⁻²)	hoja a	6.81	5.05	0.03	6.14	5.72	ns	5.56	6.30	ns	ns	ns	ns
	hoja b	5.25	3.62	0.04	4.81	4.06	0.05	3.41	5.46	<.001	ns	ns	ns
	hoja c	2.34	2.29	ns	2.41	2.21	ns	1.75	2.87	0.01	ns	ns	ns
% Rubisco (% en prot.)	hoja a	67.7	61.0	0.09	64.8	63.9	ns	63.8	64.9	ns	ns	ns	ns
	hoja b	56.6	47.9	ns	53.5	51.1	ns	46.7	57.9	0.003	ns	ns	ns
	hoja c	33.2	39.3	ns	38.2	34.4	ns	32.5	40.1	0.01	ns	ns	ns
10 días después de antesis													
Prot/p (mg g ⁻¹)	hoja a	22.8	17.7	0.05	19.9	20.6	ns	19.2	21.3	0.05	ns	ns	ns
	hoja b	11.6	9.05	0.03	10.8	9.79	ns	10.0	10.6	ns	0.07	ns	ns
Prot/A (g m ⁻²)	hoja a	4.84	3.88	0.01	4.44	4.27	ns	4.12	4.59	0.06	ns	0.05	0.09
	hoja b	2.44	2.11	ns	2.39	2.16	ns	2.22	2.33	ns	ns	ns	ns
Rbco/p (nmol g ⁻¹)	hoja a	24.3	18.7	ns	21.4	21.7	ns	18.2	24.8	0.01	ns	ns	ns
	hoja b	9.30	6.62	0.07	8.79	7.12	ns	6.97	8.94	ns	ns	ns	ns
Rbco/A (μmol m ⁻²)	hoja a	5.19	4.05	ns	4.76	4.48	ns	3.91	5.34	0.01	ns	ns	ns
	hoja b	1.98	1.53	ns	1.94	1.57	ns	1.54	1.97	ns	ns	ns	ns
% Rubisco (% en prot.)	hoja a	56.5	52.8	ns	55.7	53.6	ns	49.9	59.4	0.01	ns	ns	ns
	hoja b	37.4	31.4	0.05	35.8	33.0	ns	32.1	36.7	0.06	ns	ns	ns

Resultados

Diez días después de la antesis, el crecimiento en CO₂ elevado disminuyó el contenido de proteína soluble de las hojas **a** - por unidad de peso y de superficie foliar - y **b** - sólo por unidad de peso foliar - (Tabla 4.2.9). En la hoja **a** la disminución de la Prot/A con el CO₂ elevado alcanzó significación sólo en plantas con suministro abundante de nitrógeno. En la hoja **b** la disminución de Prot/p fue significativa sólo en plantas que no recibieron CK (Fig. 4.2.12 c). La aplicación de nitrógeno abundante aumentó el contenido de Prot/A en la hoja **a** en CO₂ ambiente, pero no en CO₂ elevado. En esta hoja el nitrógeno en dosis abundante aumentó el contenido de Prot/A en plantas que recibieron aspersión de CK y no en las controles sin CK (P= 0.09, Fig. 4.2.11 c). En la hoja **b** no hubo efecto de la dosis de nitrógeno en el contenido de proteína soluble. La aspersión de CK disminuyó el contenido de Prot/p en la hoja **b** de plantas que crecían en CO₂ ambiente y no en CO₂ elevado (Fig. 4.2.12 c).

No hubo efectos significativos del CO₂ elevado en el contenido de proteína Rubisco de la hoja **a**, mientras que hubo una disminución de la Rbco/p en la hoja **b**. El nitrógeno en dosis abundante aumentó la proteína Rubisco de la hoja **a** y no tuvo efecto significativo en la **b** (Tabla 4.2.9). Tampoco se encontraron efectos significativos de la aspersión con CK en el contenido de proteína Rubisco en esta fecha. El CO₂ elevado no tuvo efecto en el % Rubisco en la hoja **a** y disminuyó esta proporción en la hoja **b** (Tabla 4.2.9). El nitrógeno en dosis alta aumentó el % Rubisco en la proteína soluble de las hojas **a** y **b**. La CK no modificó este porcentaje significativamente, aunque tendió a reducirlo (Tabla 4.2.9).

4.2.6.

Contenidos de nitrógeno

4.2.6.1 Experimento de 2006

Cuatro días después de la antesis, el crecimiento con CO₂ elevado no tuvo efecto en el porcentaje de nitrógeno en materia seca (%N) en ninguna parte de la planta, excepto la interacción significativa CO₂ x nitrógeno en la hoja **b** (Tabla 4.2.10), observándose cómo el CO₂ alto disminuyó el %N con dosis bajas de fertilizante nitrogenado, pero no con dosis abundante - no mostrado -. La adición de más nitrógeno aumentó significativamente el %N en las dos hojas superiores y en el tallo, pero no en las hojas por debajo de la **b** y la espiga. La aspersion con CK aumentó el %N en el resto de las hojas y el tallo y no tuvo efecto significativo en otras partes de la planta.

El contenido de nitrógeno por órgano (Nt) no se modificó significativamente con la [CO₂] de crecimiento (Tabla 4.2.10), aunque las [CO₂] altas tendieron a disminuir el Nt en las dos hojas superiores a la vez que tendieron a aumentarlo en tallo y espiga, de forma que el Nt total tendió a ser mayor con CO₂ elevado que ambiente. La adición de más nitrógeno aumentó significativamente el Nt de todos los órganos y la aspersion con CK aumentó el Nt en el resto de las hojas (Tabla 4.2.10).

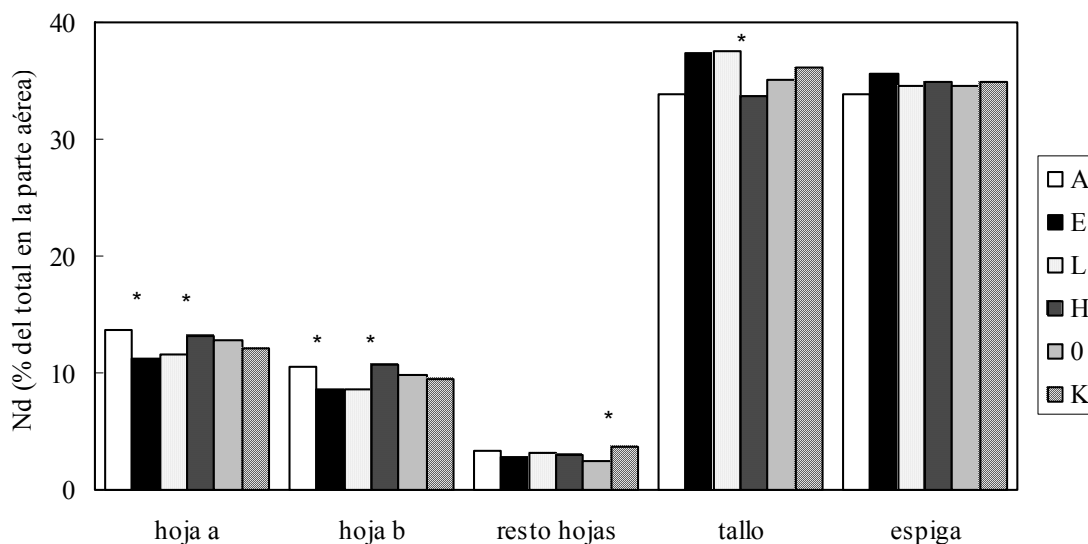


Figura 4.2.13. Distribución porcentual del nitrógeno entre órganos (Nd) del trigo en la postantesis del experimento de año 2006 crecido en las TGCs con CO₂ ambiente (A) o elevado (E), sin (0) o con aspersion con citoquinina (K), y con suministro bajo (L) o alto (H) de nitrógeno. Los asteriscos representan diferencias significativas - véase la Tabla 4.2.10 -.

Resultados

El CO₂ elevado afectó a la distribución porcentual del nitrógeno entre órganos (Nd), disminuyendo significativamente su adscripción a las dos hojas superiores (Tabla 4.2.10, Fig. 4.2.13) y tendiendo a aumentar su adscripción al tallo. Un aporte abundante de nitrógeno tuvo el efecto contrario y aumentó la adscripción de este nutriente a las dos hojas superiores a la vez que la disminuyó en el tallo (Tabla 4.2.10, Fig. 4.2.13). La interacción CK x nitrógeno indicó que la dosis abundante de fertilizante nitrogenado redujo el porcentaje del nitrógeno total asignado al tallo sólo en las plantas que recibieron CK; la aplicación de esta hormona no tuvo un efecto significativo con aporte abundante de nitrógeno y en cambio elevó el Nd del tallo con dosis baja de nitrógeno - no mostrado -. La CK aumentó también la adscripción de nitrógeno al resto de hojas (Fig. 4.2.13). Por último, el CO₂ elevado provocó descensos de la cantidad de nitrógeno por unidad de área foliar (N_A) del resto de hojas cuando recibían una mayor dosis de nitrógeno. La abundancia de este nutriente y el empleo de CK aumentaron N_A en las hojas **a**, **b**, resto de hojas y parte aérea de forma significativa, mientras que las [CO₂] elevadas tendieron a reducirla (Tabla 4.2.10).

En la madurez - cosecha final - se observó que en el grano, las glumas y raquis el CO₂ elevado disminuyó el %N sólo en plantas con CK, y esta hormona aumentó el %N con CO₂ ambiente, pero no con CO₂ elevado (Fig. 4.2.14); esta interacción alcanzó significación (Tabla 4.2.10) en las glumas y raquis - efecto significativo de la CK - y en el grano - efecto significativo del CO₂ - (Fig. 4.2.14). Más aún, la disminución con el CO₂ elevado del %N en el grano ocurrió en plantas con nitrógeno abundante, pero no con nitrógeno bajo - interacción no mostrada -. El nitrógeno en dosis alta aumentó el %N en todas las partes de la planta; a su vez, la aspersion con CK aumentó el %N en el tallo de 0.35 % a 0.43 % y no tuvo efectos significativos en el %N de las otras partes de la planta, aunque tendió a elevarlos.

Tabla 4.2.10. Porcentaje de nitrógeno en la materia seca (N), contenido de nitrógeno por órgano (Nt), fracción del nitrógeno total de la parte aérea en cada órgano (Nd) y contenido de nitrógeno por unidad de superficie (N_A) en dos fases del crecimiento del trigo del año 2006, crecido en las TGCs con CO₂ ambiente (A) o elevado (E), sin (0) o con aspersión de citoquinina (K) y adición baja (L) o alta (H) de nitrógeno. *P* es la probabilidad del análisis de la varianza para cada factor y las interacciones simples entre el CO₂ y la citoquinina (C.K), el CO₂ y el nitrógeno (C.N) y la citoquinina y el nitrógeno (K.N).

		CO ₂		<i>P</i>	Citoquinin			Nitrógeno		<i>P</i>	<i>Interacciones(P)</i>		
		A	E		0	K	<i>P</i>	L	H		C.K	C.N	K.N
4 días después de antesis													
N										<.00			
(% mat. seca)	hoja a	3.69	3.29	ns	3.57	3.41	ns	3.30	3.68	1	ns	ns	ns
	hoja b	3.08	2.84	ns	2.97	2.95	ns	2.71	3.21	0.01	ns	0.05	ns
	resto hojas	1.41	1.37	ns	1.15	1.63	0.01	1.30	1.48	ns	ns	ns	ns
		0.87	0.82		0.79	0.90	0.0	0.77	0.93				
	tallos	6	9	ns	9	6	5	4	0	0.01	ns	ns	ns
	espiga	1.80	1.77	ns	1.83	1.75	ns	1.73	1.85	ns	ns	ns	ns
Nt										<.00			
(mg órgano ⁻¹)	hoja a	5.20	4.52	ns	4.86	4.87	ns	3.69	6.03	1	ns	ns	ns
	hoja b	4.05	3.51	ns	3.73	3.83	ns	2.70	4.86	1	ns	ns	ns
	resto hojas	3.16	2.78	ns	2.62	3.32	2	2.43	3.52	0.01	ns	ns	ns
	tallos	13.0	14.6	ns	13.5	14.0	ns	12.3	15.3	0.01	ns	ns	ns
	espiga	12.9	14.2	ns	13.0	14.1	ns	11.1	16.0	1	ns	ns	ns
	parte aérea	37.9	39.9	ns	37.7	40.1	ns	31.9	45.8	1	ns	ns	ns
Nd				0.0									
(% total)	hoja a	13.6	11.2	2	12.8	12.1	ns	11.6	13.2	0.02	ns	ns	ns
	hoja b	10.6	8.60	1	9.79	9.40	ns	8.57	10.6	1	ns	ns	ns
	resto hojas	3.38	2.82	ns	2.47	3.71	1	3.21	2.97	ns	ns	ns	ns
	tallos	33.9	37.3	ns	35.1	36.1	ns	37.5	33.7	1	ns	ns	0.05
	espiga	33.8	35.7	ns	34.6	34.9	ns	34.6	34.9	ns	ns	ns	ns
N _A						0.0							
(g m ⁻²)	hoja a	2.40	2.13	ns	2.13	2.41	7	2.00	2.53	0.01	ns	ns	ns
	hoja b	1.90	1.63	ns	1.61	1.93	2	1.48	2.06	1	ns	ns	ns
	resto hojas	1.33	1.25	ns	1.18	1.41	7	1.26	1.33	ns	ns	0.04	ns
	parte aérea	2.20	2.17	ns	2.03	2.33	3	2.02	2.34	0.02	ns	ns	ns
Madurez													
N	glumas	0.59	0.50		0.51	0.57		0.48	0.61				
		2	3	ns	8	7	ns	3	2	0.03	0.07	ns	ns
				0.0									
(% mat. seca)	grano	2.60	2.33	1	2.43	2.50	ns	2.34	2.59	0.02	0.06	0.01	ns
	tallos,hojas	0.45	0.33	ns	0.35	0.42	0.0	0.30	0.47	<.00	ns	ns	ns

Resultados

		1	0		3	8	3	6	5	1			
Nt (mg órgano ⁻¹)	glumas	3.61	3.91	ns	3.38	4.14	ns	3.27	4.25	0.04	0.05	ns	ns
	grano	35.8	43.1	ns	39.1	39.8	ns	37.6	41.3	ns	ns	ns	ns
	tallo,hojas	5.45	4.89	ns	4.57	5.77	2	4.06	6.28	1	ns	ns	ns
	parte aérea	44.8	51.9	ns	47.1	49.7	ns	44.9	51.8	ns	ns	ns	ns
Nd (% total)	glumas	8.21	7.56	ns	7.22	8.55	ns	7.54	8.23	ns	ns	ns	ns
	grano	79.9	83.0	ns	83.1	79.8	5	83.2	79.7	0.03	ns	ns	ns
	tallo,hojas	11.9	9.41	ns	9.72	11.6	8	9.24	12.1	0.01	ns	ns	ns

El Nt aumentó con la adición de más nitrógeno en glumas y raquis y en tallo y hojas, pero no en el grano (Tabla 4.2.10), y la CK lo incrementó en el tallo y las hojas. La CK elevó el Nt de las glumas y el raquis en CO₂ ambiental sin tener efecto significativo en CO₂ elevado, como ya se observó para el %N - no mostrado -. El nitrógeno total en la parte aérea de la planta no cambió significativamente con los tratamientos experimentales.

Con respecto a la distribución del nitrógeno entre las partes de la planta, el CO₂ elevado no tuvo efecto, mientras que con dosis alta de nitrógeno hubo mayor Nd en el tallo y las hojas, y menos en el grano. La aplicación de CK produjo el mismo cambio que la adición de más nitrógeno en la partición de este nutriente entre órganos (Tabla 4.2.10).

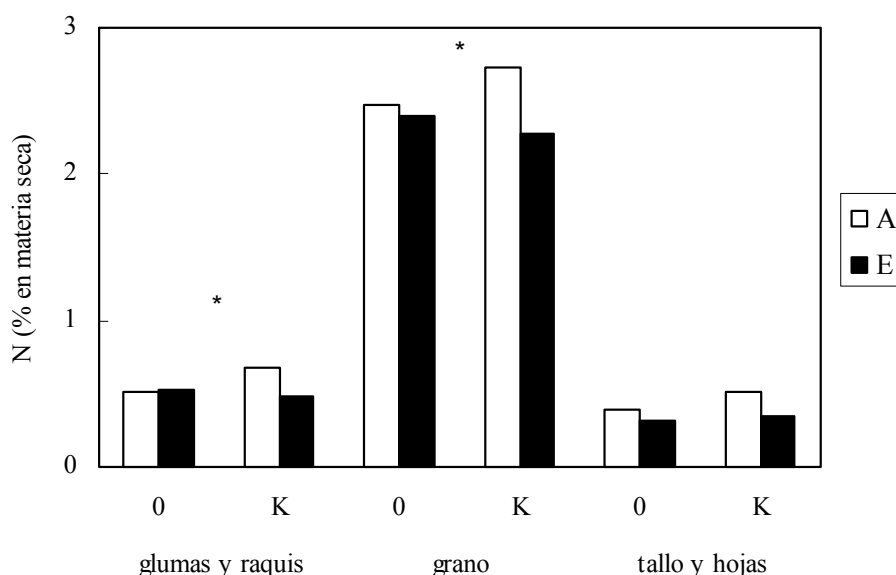


Figura 4.2.14. Efecto de la aplicación de citoquinina sobre el porcentaje de nitrógeno en materia seca de los diferentes órganos en la madurez del experimento con trigo de 2006, crecido en las TGCs con CO₂ ambiente (A) o elevado (E) y sin (0) o con aspersión con citoquinina (K). Los asteriscos representan diferencias significativas - véase la tabla 4.2.10 -.

4.2.6.2 Experimento de 2007

En la antesis el CO₂ elevado tendió a disminuir el %N en todos los órganos de la planta, aunque este efecto sólo fue significativo en la hoja **a** y en el tallo (Tabla 4.2.11). Una mayor dosis de nitrógeno aumentó la concentración de este nutriente en todas las partes de la planta, pero en la espiga el aumento ocurrió a las [CO₂] atmosféricas actuales y no tuvo efecto con el doble de [CO₂]. La aspersión con CK aumentó el porcentaje de nitrógeno en el tallo y no tuvo efectos en otras partes de la planta (Tabla 4.2.11).

Respecto al Nt, en todos los órganos se encontraron reducciones debidas al CO₂ elevado, que alcanzaron significación tanto en la hoja **b** como en el total de la parte aérea (Tabla 4.2.11). El CO₂ elevado interactuó también con el nitrógeno sobre el Nt del tallo y de toda la parte aérea; así, el CO₂ elevado disminuyó el Nt en plantas con nitrógeno bajo y no con suministro abundante del nutriente (Fig. 4.2.15 a). El aumento del CO₂ en el aire redujo el Nt de la parte aérea en las plantas control sin CK pero no tuvo efecto cuando las plantas recibieron CK (Fig. 4.2.15 a). La CK redujo el Nt de la hoja **b** (Tabla 4.2.11). En el tallo, la espiga y la parte aérea, la aspersión con CK disminuyó el Nt en plantas de CO₂ ambiente, pero no en las de CO₂ elevado (Fig. 4.2.15 a). Además, combinada con dosis bajas de nitrógeno, esta hormona aumentó el Nt del tallo, mientras que con dosis altas del fertilizante nitrogenado lo disminuyó - no mostrado -. La dosis alta de nitrógeno aumentó significativamente el Nt en todos los órganos (Tabla 4.2.11).

El CO₂ elevado redujo el Nd adscrito a la hoja **a** en plantas que recibieron CK, pero no en las control sin esta hormona (Fig. 4.2.15 b). La CK, por su parte, redujo el Nd en la hoja **a** sólo en plantas de CO₂ elevado. La aspersión con CK disminuyó la adscripción a la espiga del nitrógeno total de la parte aérea en plantas de CO₂ ambiente y no en las de CO₂ elevado (Fig. 4.2.15 b). El nitrógeno en dosis alta aumentó el Nd en la hoja **a** (Tabla 4.2.11). También redujo el % asignado a la espiga, así como Nd del tallo en plantas crecidas con CO₂ ambiente, pero no tuvo efecto con CO₂ alto - no mostrado -.

Con respecto al N_A, el CO₂ elevado lo redujo en la hoja **a** (P=0.07) y en el total de la parte aérea si las plantas no recibían CK. Esta hormona no lo afectó significativamente en ninguna hoja en este estadio de desarrollo, pero en CO₂ alto la aspersión de CK generó aumentos del N_A del total de la parte aérea. El aumento en la dosis de fertilizante nitrogenado fue el factor que incrementó en mayor medida el N_A, tanto en la hoja **a** como en la hoja **b** y en la parte aérea (Tabla 4.2.11).

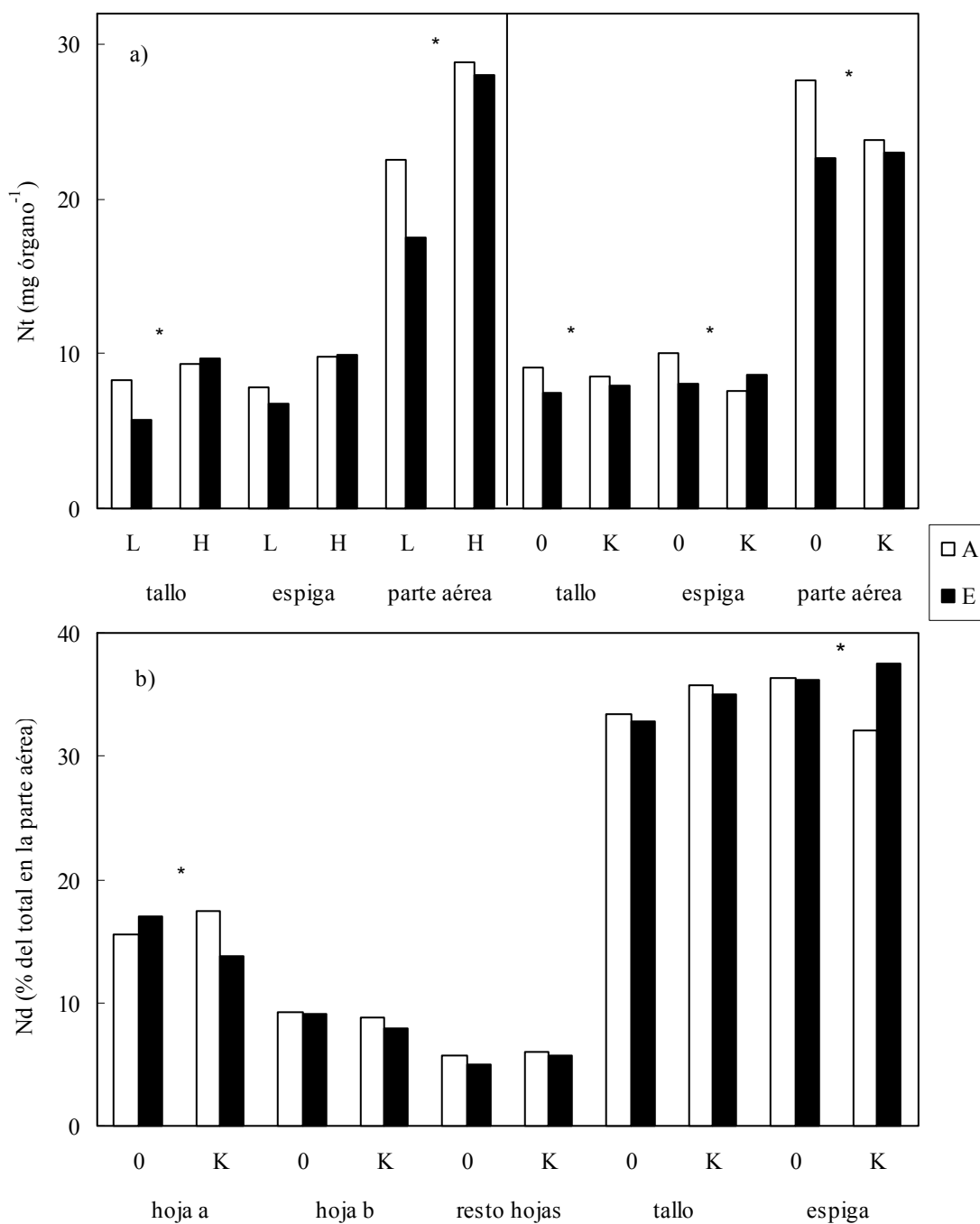


Figura 4.2.15. a) Interacciones CO₂ x nitrógeno o CO₂ x CK sobre a) el contenido de nitrógeno por órgano (Nt) en tallo, espiga y parte aérea - no se muestran las hojas **a** y **b**, ya que estas interacciones no fueron significativas -, b) el porcentaje del nitrógeno total adscrito a cada órgano (Nd) en la antesis del trigo crecido en las TGCs con CO₂ ambiente (A) o elevado (E), sin (0) o con adición de citoquinina (K), y con suministro bajo (L) o alto (H) de nitrógeno en el experimento del año 2007. Los asteriscos representan diferencias significativas.

Dieciocho días después de la antesis - 18 dda -, el CO₂ elevado tendió a reducir el %N en todos los órganos de la planta, pero este efecto sólo alcanzó significación estadística en la hoja **a** de plantas con aporte alto de nitrógeno (Tabla 4.2.11, Fig. 4.2.16 a). Una dosis abundante de nitrógeno aumentó el %N en la espiga, el tallo y las hojas restantes bajo ambas

Resultados

[CO₂]; en las hojas **a** y **b** la adición de más nitrógeno sólo aumentó el %N en CO₂ ambiente. La aspersión con CK disminuyó el %N en la espiga cuando se combinó con CO₂ elevado y no con CO₂ ambiente - no mostrado -.

Los descensos en el nitrógeno debidos al CO₂ elevado y los aumentos producidos por la adición de más nitrógeno fueron más patentes al analizar Nt. El CO₂ elevado lo redujo de forma significativa en la hoja **b**, el resto de hojas, la espiga y toda la parte aérea (Tabla 4.2.11). El CO₂ elevado disminuyó también el Nt de la hoja **a** en interacción con aporte abundante de nitrógeno, pero no con aporte escaso - no mostrado -. Por su parte, la mayor dosis de nitrógeno elevó el Nt de de toda la parte aérea y los diferentes órganos, excepto la espiga y el resto de hojas. La CK afectó de forma significativa al tallo solamente, reduciendo su Nt (Tabla 4.2.11).

Los Nd de la espiga y la hoja **a** disminuyeron con el CO₂ elevado, en la primera con dosis baja de nitrógeno y en la segunda, en cambio, con dosis alta (Fig. 4.2.16 c). El Nd del tallo, en contraste, aumentó con el CO₂ elevado cuando se añadió una dosis baja de nitrógeno. La adición de más nitrógeno elevó el Nd de la hoja **a** y del tallo en CO₂ ambiente, pero no en CO₂ elevado (Fig. 4.2.16 c). Por el contrario, una dosis alta de nitrógeno redujo la adscripción de este nutriente a la espiga en plantas crecidas en CO₂ ambiental, pero no en CO₂ elevado (Fig. 4.2.16 c). El nitrógeno también elevó el Nd de la hoja **b** (Tabla 4.2.11). La CK modificó el reparto del nitrógeno entre órganos, de manera que con aplicación de CK se adscribió menos nitrógeno al tallo y más a la espiga (Tabla 4.2.11).

La mayor dosis de nitrógeno elevó el N_A de las hojas **a** y **b** sólo bajo CO₂ ambiental, y el descenso del N_A provocado con la duplicación del CO₂ atmosférico se dio con dosis abundante de nitrógeno y no con dosis baja (Fig. 4.2.16 d). El CO₂ elevado disminuyó también el N_A del total de la parte aérea. La CK elevó este parámetro en las dos hojas superiores del dosel y en la parte aérea, siendo significativo el efecto para la hoja **b** (Tabla 4.2.11).

Tabla 4.2.11. Porcentaje de nitrógeno en la materia seca (N), contenido de nitrógeno por órgano (Nt), fracción del nitrógeno total de la parte aérea en cada órgano (Nd) y contenido de nitrógeno por unidad de superficie (N_A) en tres fases del crecimiento del trigo en 2007, crecido en las TGCs con CO₂ ambiente (A) o elevado (E), sin (0) o con aspersión de citoquinina (K) y adición baja (L) o alta (H) de nitrógeno. *P* es la probabilidad del análisis de la varianza para cada factor y las interacciones simples entre el CO₂ y la citoquinina (C.K), el CO₂ y el nitrógeno (C.N) y la citoquinina y el nitrógeno (K.N).

		CO ₂			Citoquinina			Nitrógeno			<i>Interacciones (P)</i>		
		A	E	<i>P</i>	0	K	<i>P</i>	L	H	<i>P</i>	C.K	C.N	K.N
Antesis													
N (% mat. seca)	hoja a	3.19	2.69	0.03	2.98	2.91	ns	2.58	3.31	<.001	ns	ns	ns
	hoja b	2.21	2.08	ns	2.18	2.10	ns	1.83	2.45	<.001	ns	ns	ns
	resto_hojas	1.49	1.29	ns	1.35	1.43	ns	1.15	1.63	<.001	ns	ns	ns
	tallos	0.700	0.627	0.07	0.625	0.702	0.07	0.526	0.800	<.001	ns	ns	ns
	espiga	2.05	1.79	ns	2.00	1.85	ns	1.68	2.16	<.001	ns	0.01	ns
Nt (mg órgano ⁻¹)	hoja a	4.28	3.57	ns	4.15	3.7	ns	2.84	5.00	<.001	ns	ns	ns
	hoja b	2.35	1.93	0.04	2.31	1.97	0.04	1.74	2.55	<.001	ns	ns	ns
	resto hojas	1.49	1.22	ns	1.35	1.36	ns	1.11	1.59	0.01	ns	ns	ns
	tallos	8.80	7.71	ns	8.298	8.22	ns	7.03	9.49	<.001	0.02	<.001	0.01
	espiga	8.82	8.34	ns	9.04	8.12	ns	7.31	9.85	0.01	0.04	ns	ns
	parte aérea	25.7	22.8	0.04	25.2	23.4	ns	20.0	28.5	<.001	0.06	0.06	ns
Nd (% total)	hoja a	16.5	15.4	ns	16.3	15.6	ns	14.2	17.7	<.001	0.01	ns	ns
	hoja b	8.98	8.55	ns	9.15	8.38	ns	8.67	8.86	ns	ns	ns	ns
	resto hojas	5.83	5.32	ns	5.29	5.85	ns	5.48	5.66	ns	ns	ns	ns
	tallos	34.6	33.9	ns	33.1	35.4	ns	35.0	33.5	ns	ns	0.04	ns
	espiga	34.2	36.8	ns	36.2	34.8	ns	36.7	34.3	0.07	0.05	ns	ns
N _A (g m ⁻²)	hoja a	1.80	1.64	0.07	1.73	1.71	ns	1.48	1.96	<.001	ns	ns	ns
	hoja b	1.28	1.32	ns	1.25	1.36	ns	1.08	1.52	<.001	ns	ns	ns
	resto hojas	2.17	1.99	ns	1.94	2.21	ns	1.88	2.28	ns	ns	ns	ns
	parte aérea	1.84	1.74	ns	1.76	1.83	ns	1.57	2.01	<.001	0.04	ns	ns

Resultados

Tabla 4.2.11. (Continuación)

		CO ₂			Citoquinina			Nitrógeno			<i>Interacciones(P)</i>		
		A	E	P	0	K	P	L	H	P	C.K	C.N	K.N
18 días después de antesis													
N (% mat. seca)	hoja a	2.94	2.53	ns	2.80	2.67	ns	2.37	3.10	<.001	ns	<.001	ns
	hoja b	2.02	1.81	ns	1.98	1.86	ns	1.59	2.25	<.001	ns	0.06	ns
	resto hojas	1.18	1.13	ns	1.18	1.13	ns	0.940	1.37	<.001	ns	ns	ns
	tallo	0.622	0.576	ns	0.621	0.576	ns	0.465	0.732	<.001	ns	0.01	ns
	Espiga	1.93	1.73	ns	1.85	1.81	ns	1.67	1.98	<.001	0.01	0.05	ns
Nt (mg órgano ⁻¹)	hoja a	3.47	2.78	ns	3.27	2.98	ns	2.25	4.00	<.001	ns	0.02	ns
	hoja b	1.65	1.19	0.07	1.53	1.31	ns	1.12	1.72	0.01	ns	ns	ns
	resto hojas	0.773	0.563	0.05	0.700	0.636	ns	0.609	0.726	ns	ns	ns	ns
	tallo	8.58	7.90	ns	9.06	7.42	0.01	6.76	9.72	<.001	ns	ns	ns
	espiga	14.6	11.5	0.07	13.2	12.9	ns	13.1	13.0	ns	ns	ns	ns
parte aérea	29.1	23.9	0.03	27.7	25.3	ns	23.9	29.1	0.01	ns	ns	ns	
Nd (% total)	hoja a	12.0	11.5	ns	11.9	11.6	ns	9.78	13.7	<.001	ns	0.01	ns
	hoja b	5.69	4.89	ns	5.47	5.10	ns	4.74	5.83	0.03	ns	ns	ns
	resto hojas	2.70	2.36	ns	2.57	2.50	ns	2.57	2.49	ns	ns	ns	ns
	tallo	29.4	33.0	ns	33.1	29.2	0.01	29.1	33.3	0.01	ns	0.04	ns
	espiga	50.2	48.3	ns	46.9	51.6	0.05	53.8	44.7	<.001	ns	0.02	ns
N _A (g m ⁻²)	hoja a	1.58	1.55	ns	1.54	1.59	ns	1.39	1.73	<.001	ns	0.01	0.07
	hoja b	1.22	1.11	0.09	1.06	1.27	0.02	1.02	1.31	0.01	ns	0.03	ns
	parte aérea	2.37	2.23	0.06	2.26	2.34	ns	2.19	2.41	ns	ns	ns	ns
Madurez													
N (% mat. seca)	glumas	0.734	0.7	ns	0.646	0.788	ns	0.608	0.827	0.02	ns	ns	ns
	grano	2.08	1.91	ns	1.97	2.02	ns	1.95	2.04	ns	ns	ns	0.07
	tallo,hojas	0.578	0.517	ns	0.511	0.584	0.09	0.429	0.665	<.001	ns	ns	ns
Nt (mg órgano ⁻¹)	glumas	4.81	4.53	ns	4.01	5.33	0.01	4.04	5.30	0.01	ns	ns	ns
	grano	21.9	20.2	ns	22.3	19.8	ns	22.7	19.4	ns	ns	ns	ns
	tallo,hojas	5.71	5.48	ns	4.96	6.22	ns	4.73	6.46	0.04	ns	ns	0.08
	parte aérea	32.4	30.2	ns	31.3	31.4	ns	31.5	31.2	ns	ns	ns	ns
Nd (% total)	glumas	15.3	15.0	ns	13.4	16.9	0.07	12.9	17.4	0.02	ns	ns	ns
	grano	66.7	67.0	ns	70.4	63.3	ns	72.1	61.6	0.03	ns	ns	ns
	tallo,hojas	18.0	18.1	ns	16.3	19.8	ns	15.0	21.0	0.05	ns	ns	ns

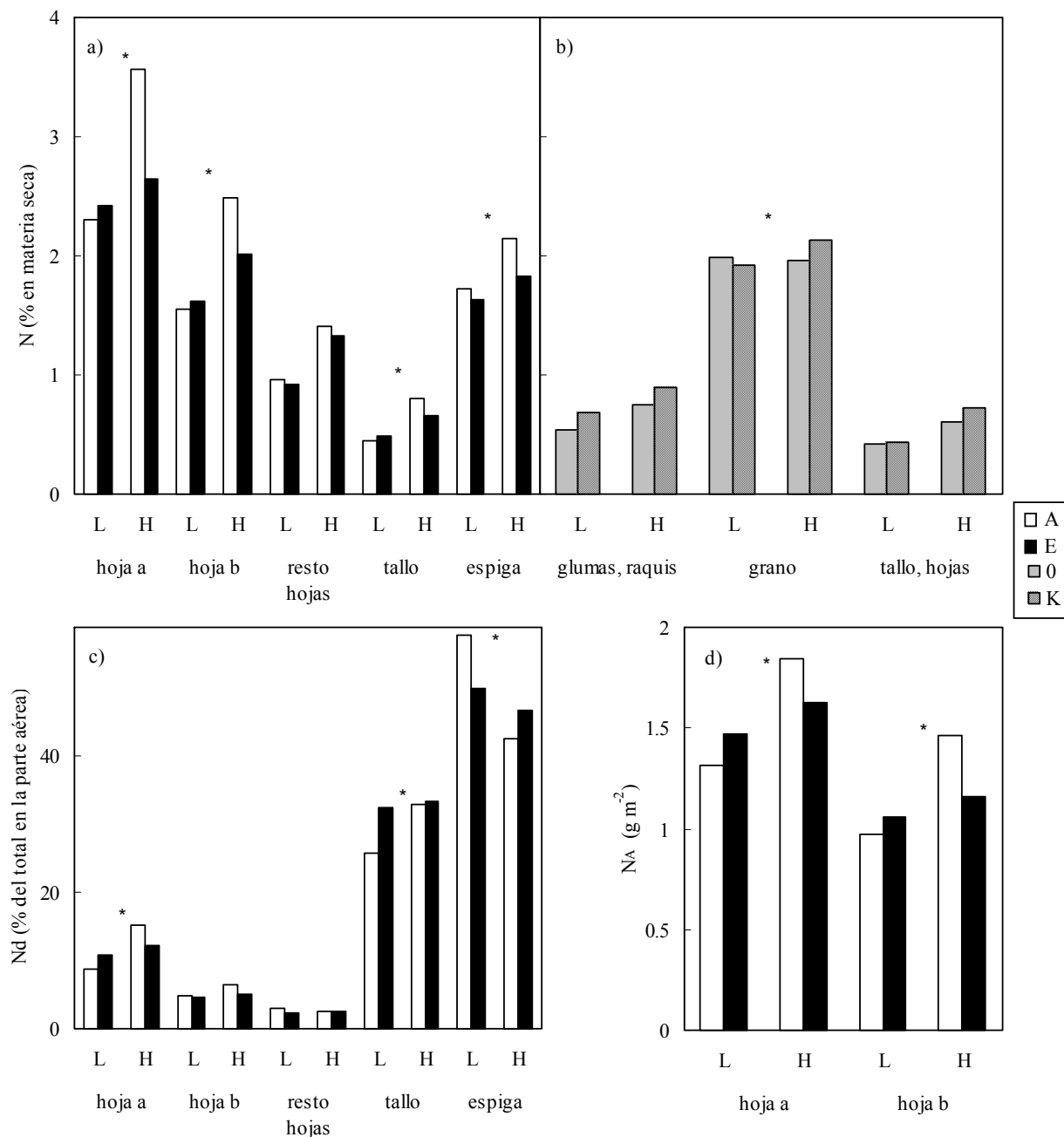


Figura 4.2.16. Porcentaje de nitrógeno en materia seca a) en la postanthesis - 18 dda -, y b) en la madurez; c) nitrógeno adsorcido en los diferentes órganos (Nd) y d) contenidos de nitrógeno por área foliar (N_A) en la postanthesis - 18 dda - del trigo crecido en las TGCs del experimento del año 2007 con CO₂ ambiente (A) o elevado (E), sin (0) o con aspersión con citoquinina (K) y con suministro bajo (L) o alto (H) de nitrógeno. Los asteriscos representan diferencias significativas - véase la Tabla 4.2.11 -.

En la madurez, el CO₂ elevado no tuvo efecto sobre el %N en ninguna fracción de la planta, y la dosis alta de fertilizante lo aumentó en las glumas y el raquis y en el tallo (Tabla 4.2.11). Se encontró una interacción entre CK y nitrógeno sobre el %N del grano, consistente en un efecto positivo de la adición de más nitrógeno sólo en las plantas que

Resultados

recibieron CK (Fig. 4.2.16 b). La dosis alta de nitrógeno incrementó el Nt de glumas y raquis y el tallo con las hojas (Tabla 4.2.11). En el tallo, la dosis alta de este nutriente aumentó el Nt sólo en combinación con CK. A su vez, esta hormona aumentó el Nt del tallo con nitrógeno abundante, pero no con nitrógeno escaso ($P=0.07$). El CO_2 elevado no modificó la distribución del nitrógeno entre partes de la planta, mientras que un suministro alto de nitrógeno disminuyó la adscripción al grano de este nutriente y la aumentó significativamente en las glumas y raquis y en el tallo (Tabla 4.2.11). El efecto de la CK sobre el Nd de las tres fracciones de la planta fue similar al descrito para la adición de más nitrógeno, pero sólo fue significativo en glumas y raquis (Tabla 4.2.11).

4.2.7.

Parámetros de crecimiento

4.2.7.1 Experimento de 2006

Cuatro días después de anthesis el CO₂ elevado aumentó el área de la espiga y no modificó la de otros órganos de la planta (Tabla 4.2.12). El nitrógeno en dosis alta aumentó el área de todas las partes de la planta - en el resto de hojas lo hizo sólo en plantas de CO₂ elevado -. La CK aumentó el área de la espiga en plantas con dosis baja de nitrógeno, pero no con dosis alta - interacciones no mostradas -; en contraste, la CK disminuyó el área de la hoja **b** (Fig. 4.2.17 b).

La mayor [CO₂] no tuvo efectos en el peso fresco de las distintas partes de la planta (Tabla 4.2.12), aumentó el peso seco de las dos primeras hojas con suministro bajo de nitrógeno y lo disminuyó con suministro alto (Fig. 4.2.18 a); y no afectó al peso seco de otras partes de la planta (Tabla 4.2.12). La adición de más nitrógeno aumentó los pesos fresco - no mostrado - y seco de todas las partes de la planta, aunque en la hoja **a** este efecto solo fue significativo en plantas de CO₂ ambiente (Tabla 4.2.12, Fig. 4.2.18 a). La aspersion con CK aumentó los pesos fresco y seco de la espiga (Fig. 4.2.17 a). El enriquecimiento en CO₂ de la atmósfera aumentó el porcentaje de humedad (%H) de la hoja **b** en plantas con dosis altas de nitrógeno y no tuvo efecto en las que recibieron una aplicación baja del nutriente (Tabla 4.2.12, Fig. 4.2.18 b); esta interacción CO₂ x nitrógeno se observó también en las hojas **a** y restantes pero no alcanzó significación. Por su parte, el nitrógeno en dosis alta redujo el %H de las hojas **a** y **b** con CO₂ ambiental sin alcanzar significación con el doble de [CO₂] (Tabla 4.2.12, Fig. 4.2.18 b). La aspersion con CK disminuyó el %H de la hoja **b** y tendió a producir el mismo efecto en la hoja **a**. La duplicación del CO₂ atmosférico no tuvo efecto en el peso seco por unidad de superficie (LMA) de la hoja **a** (Tabla 4.2.12) y disminuyó el de la hoja **b** en plantas con nitrógeno abundante y no con nitrógeno escaso (Fig. 4.2.17 e). El nitrógeno en dosis altas aumentó el LMA en la hoja **a** y, en CO₂ ambiente pero no en CO₂ elevado, en la hoja **b** (Fig. 4.2.17 e). La CK aumentó el LMA de las hojas **a** y **b** y no tuvo efecto en el resto de hojas (Tabla 4.2.12).

Resultados

Tabla 4.2.12. Área verde (cm²), pesos fresco y seco (g), porcentajes de humedad relativa (%H), peso seco por área foliar (LMA, g m⁻²) y peso fresco por área foliar (Pf:A, mg cm⁻²) medidas en dos fases del crecimiento del trigo crecido con CO₂ ambiente (A) o elevado (E), sin (0) o con aspersión de citoquinina (K) y adición baja (L) o alta (H) de nitrógeno en el año 2006. *P* es la razón de probabilidad del análisis de la varianza para cada factor por separado y en cada una de las interacciones simples entre los niveles de CO₂ y la aplicación o no de CK (C.K), entre los niveles de CO₂ y las diferentes dosis de nitrógeno (C.N) y entre las dosis de nitrógeno y la adición de CK frente a las plantas control sin CK (K.N).

		CO ₂		<i>P</i>	Citoquinina		<i>P</i>	Nitrógeno		<i>P</i>	<i>Interacciones(P)</i>		
		A	E		0	K		L	H		C.K	C.N	K.N
4 días después de antesis													
Área_verde (cm ²)	hoja a	21.2	21.0	ns	22.3	19.9	ns	18.5	23.7	0.01	ns	ns	ns
	hoja b	21.1	21.5	ns	22.6	19.3	0.05	18.2	24.4	<.001	ns	ns	ns
	resto_hojas	22.1	23.4	ns	23.0	22.5	ns	20.2	25.3	ns	ns	0.07	ns
	tallo	60.6	66.2	ns	63.9	62.9	ns	60.1	66.7	0.01	ns	ns	ns
	espiga	41.7	50.3	0.01	44.7	47.4	ns	40.2	51.9	<.001	ns	ns	0.04
	parte aérea	167	181	ns	177	172	ns	157	192	<.001	ns	ns	ns
Peso fresco (g)	hoja a	0.426	0.441	ns	0.431	0.436	ns	0.364	0.502	<.001	ns	0.08	ns
	hoja b	0.486	0.479	ns	0.491	0.475	ns	0.388	0.578	<.001	ns	0.07	ns
	resto hojas	0.636	0.666	ns	0.633	0.669	ns	0.553	0.749	0.01	ns	ns	ns
	tallo	4.97	6.51	ns	5.82	5.62	ns	5.48	6.02	0.03	ns	ns	ns
	espiga	1.96	2.31	ns	1.99	2.28	0.01	1.84	2.43	<.001	ns	ns	ns
	parte aérea	8.48	10.4	ns	9.36	9.52	ns	8.62	10.3	<.001	ns	ns	ns
Peso seco (g)	hoja a	0.140	0.136	ns	0.134	0.142	ns	0.112	0.165	<.001	ns	0.03	ns
	hoja b	0.131	0.121	ns	0.124	0.128	ns	0.100	0.152	<.001	ns	0.01	ns
	resto hojas	0.155	0.156	ns	0.150	0.161	ns	0.138	0.173	0.01	ns	ns	ns
	tallo	1.43	1.75	ns	1.59	1.56	ns	1.51	1.64	ns	ns	ns	ns
	espiga	0.707	0.798	ns	0.709	0.796	0.06	0.639	0.866	<.001	ns	ns	ns
	parte aérea	2.54	2.96	ns	2.71	2.79	ns	2.50	3.00	0.01	ns	ns	ns
Humedad (%)	hoja a	67.3	69.1	ns	68.8	67.6	0.08	69.1	67.3	0.01	ns	0.05	ns
	hoja b	73.3	74.7	ns	74.8	73.2	0.01	74.3	73.7	ns	ns	0.05	ns
	resto hojas	74.1	75.1	ns	74.6	74.6	ns	73.7	75.6	0.09	ns	ns	ns
	parte aérea	70.5	71.2	ns	70.6	71.1	ns	70.9	70.8	ns	ns	ns	ns
LMA (g m ⁻²)	hoja a	65.3	65.2	ns	59.6	70.8	0.01	60.8	69.7	0.02	ns	ns	ns
	hoja b	61.6	56.8	ns	54.7	63.7	0.02	55.0	63.4	0.03	ns	0.02	ns
	resto hojas	69.9	75.0	ns	72.6	72.3	ns	67.6	77.4	ns	ns	ns	ns
Pf:área (mg cm ⁻²)	hoja a	19.9	21.0	ns	19.1	21.9	0.01	19.7	21.3	0.09	ns	ns	ns
	hoja b	22.9	22.5	ns	21.7	23.7	ns	21.4	23.9	0.04	ns	0.05	ns
	resto hojas	28.7	29.8	ns	28.1	30.4	ns	29.0	29.5	ns	ns	ns	ns
Madurez													
Peso seco (g)	glumas	0.607	0.771	ns	0.651	0.727	0.05	0.679	0.699	ns	ns	ns	ns
	grano	1.38	1.86	ns	1.63	1.61	ns	1.61	1.63	ns	ns	ns	ns
	tallo,hojas	1.18	1.49	ns	1.31	1.36	ns	1.34	1.33	ns	ns	ns	ns
	parte aérea	3.16	4.12	ns	3.59	3.69	ns	3.63	3.66	ns	ns	ns	ns

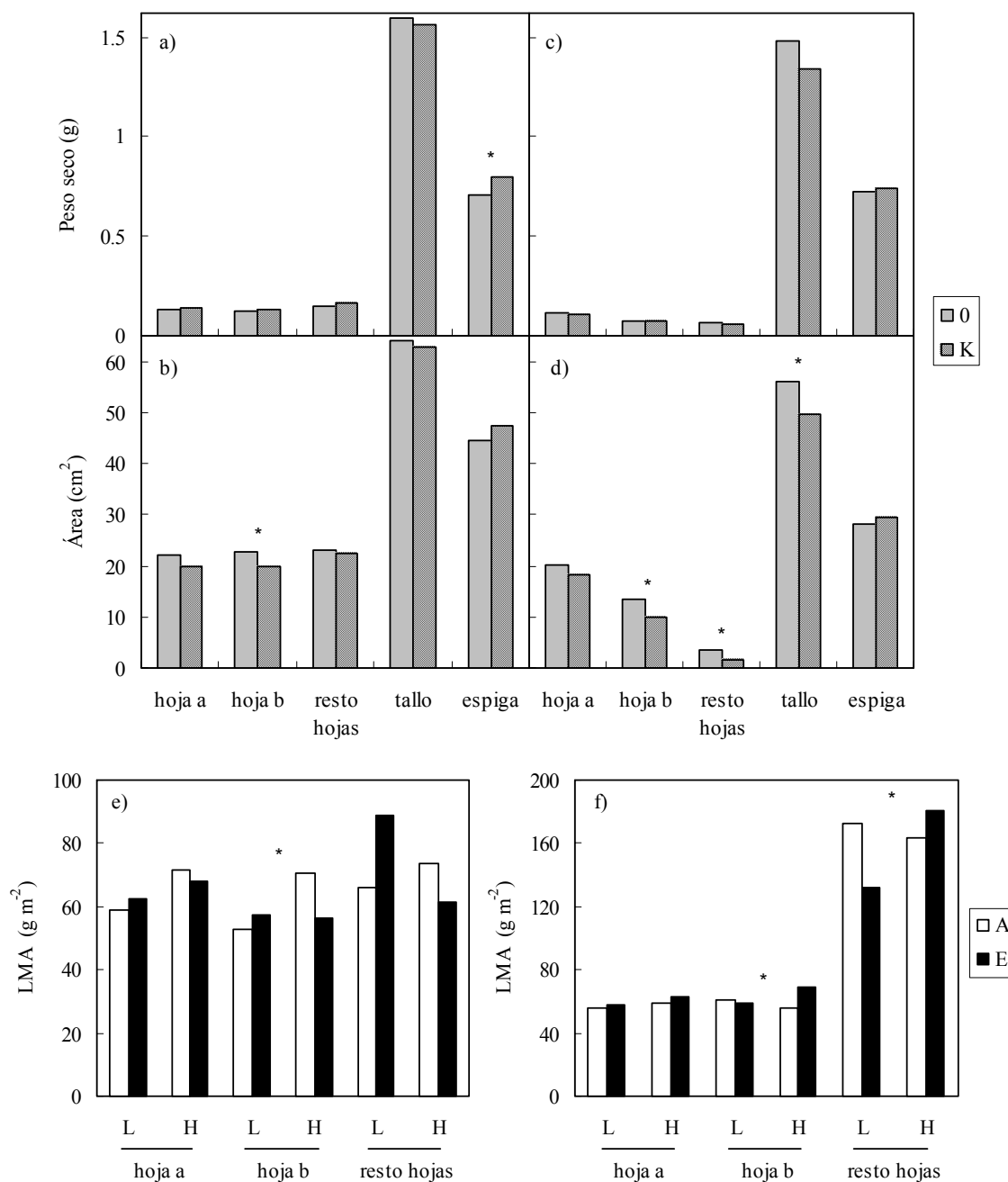
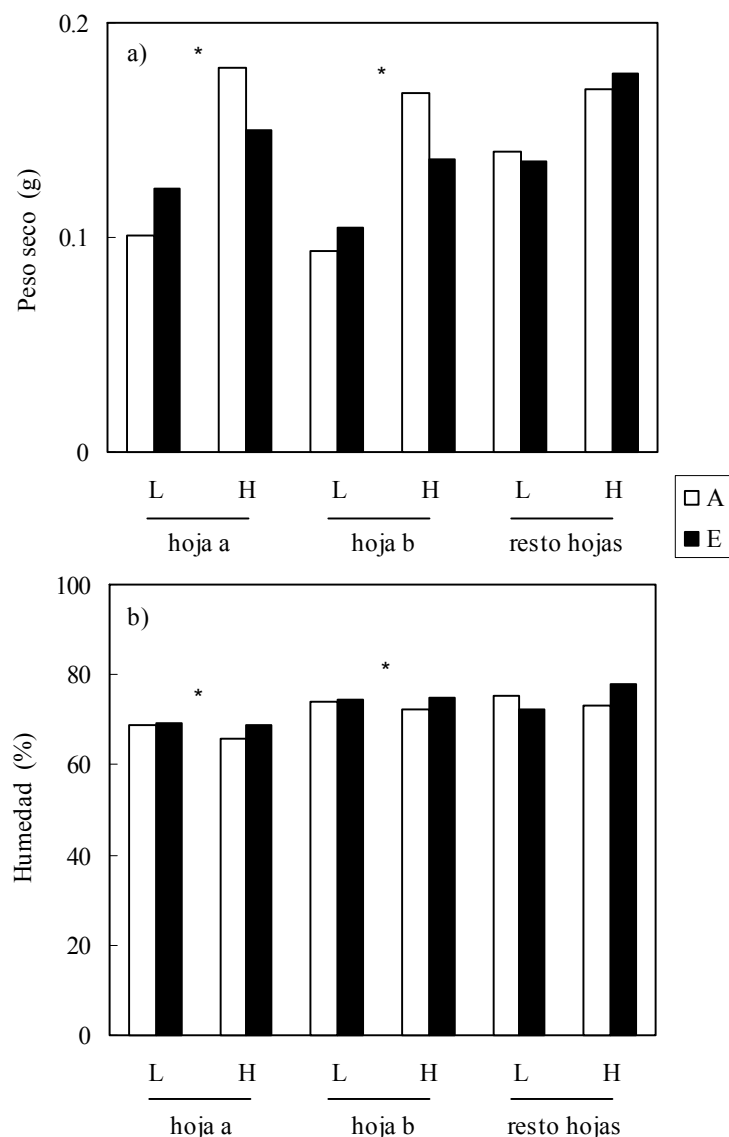


Figura 4.2.17. a, c) Peso seco y b, d) área verde, junto con e, f) las interacciones CO₂ x nitrógeno sobre el peso foliar por área (LMA), de los diferentes órganos del trigo crecido con CO₂ ambiente (A) o elevado (E), con suministro bajo (L) o abundante (H) de fertilizante nitrogenado y sin (0) o con aspersión regular de citoquinina (K), 4 dda en 2006 (a, b, e), en la antesis del 2007 (f) y en la postantesis avanzada - 18 dda - del experimento de 2007 (c, d). Los asteriscos representan diferencias significativas.

No hubo efectos significativos del CO₂ elevado en el peso fresco por unidad de superficie (Pf:A) de ninguna hoja. Aunque la significación estadística fue escasa, el nitrógeno en dosis alta aumentó el Pf:A de la hoja **a** y también el Pf:A de la hoja **b** en CO₂ ambiental, pero no

Resultados

en CO₂ elevado. La aspersion con CK también aumentó el Pf:A de las dos hojas superiores, pero el efecto sólo alcanzó significación en la hoja a (Tabla 4.2.12).



En la madurez, el CO₂ elevado fue el factor que más aumentó el peso del grano por tallo, aunque su efecto no fue significativo. La dosis de fertilizante nitrogenado tampoco tuvo efecto significativo en el rendimiento final del cultivo. El único efecto significativo en la madurez fue el aumento del peso de las glumas y raquis inducido por la aplicación de CK (Tabla 4.2.12). El índice de cosecha no se vio afectado de forma significativa por ningún tratamiento - no mostrado -.

4.2.7.2 Experimento de 2007

En la antesis el crecimiento en CO₂ elevado generó un descenso significativo (Tabla 4.2.13) del área de la espiga, del tallo, de la hoja **a** - con menor significación - y de toda la parte aérea con nitrógeno bajo, pero no con nitrógeno abundante. A su vez, la aplicación de más nitrógeno no tuvo efectos en el área de estas partes de la planta en CO₂ ambiental, pero la aumentó con CO₂ elevado - interacciones no mostradas -. La CK disminuyó el área de las dos hojas superiores, del tallo y de toda la parte aérea (Tabla 4.2.13). Como en el área, el CO₂ elevado disminuyó el peso fresco con nitrógeno bajo y no con alto en el tallo y toda la parte aérea; en la espiga y la hoja **a** se observó la misma tendencia, que no alcanzó significación. Además, el CO₂ elevado aumentó el peso fresco - no mostrado - y seco de la espiga sólo con nitrógeno abundante (Fig. 4.2.19 a, b), tendiendo a producir el mismo efecto - aunque no alcanzó significación - en el peso seco de la hoja **a** y el tallo. La aplicación de una dosis alta de nitrógeno aumentó los pesos fresco y seco de las diferentes partes de la planta en CO₂ elevado, con la excepción de las hojas restantes y el peso seco del tallo; el peso fresco de la hoja **b** y el seco de la hoja **a** aumentaron también con el nitrógeno en CO₂ ambiente. En este último, la adición de más nitrógeno disminuyó, en lugar de aumentar, el peso seco de la espiga, del tallo y de la parte aérea (Fig. 4.2.19 a, b). La aplicación regular de CK aumentó significativamente los pesos fresco y seco de la espiga solamente en CO₂ alto (Fig. 4.2.19 a, b), mientras que esta hormona redujo los pesos fresco y seco de las hojas **a** y **b** junto con el peso fresco del resto de hojas y los pesos fresco y seco del tallo (Tabla 4.2.13).

El CO₂ elevado disminuyó ligera, pero significativamente, el %H de la hoja **a** (Tabla 4.2.13). La dosis abundante de nitrógeno tuvo un efecto significativo tanto para el %H total como el %H de las hojas **a** y **b**. La CK disminuyó significativamente el %H del resto de hojas (Tabla 4.2.13). El crecimiento en CO₂ elevado aumentó significativamente el LMA de la hoja **a** (Tabla 4.2.13). La adición de más nitrógeno aumentó el LMA de la hoja **a** con las dos concentraciones de CO₂, y el de la hoja **b** y el resto de hojas con CO₂ elevado (Fig. 4.2.17 f). El nitrógeno también aumentó el LMA del resto de hojas en plantas con aspersion con CK y no en las plantas control sin la hormona. El efecto positivo de la CK en el LMA de la hoja **a** observado en 2006 no alcanzó significación en 2007 durante este estadio de crecimiento, aunque sí se produjo en la hoja **b** (Tabla 4.2.13) y, sólo con las dosis mayores de nitrógeno, en el resto de hojas - interacciones no mostradas -.

Resultados

Tabla 4.2.13. Área verde (cm²), pesos fresco y seco (g), porcentajes de humedad relativa (%H), peso seco por área foliar (LMA, g m⁻²) y peso fresco por área foliar (Pf:A, mg cm⁻²) medidas en tres fases del crecimiento del trigo crecido con CO₂ ambiente (A) o elevado (E), sin (0) o con aspersión de citoquinina (K) y adición baja (L) o alta (H) de nitrógeno en el experimento del año 2007. *P* es la razón de probabilidad del análisis de la varianza para cada factor por separado y en cada una de las interacciones simples entre los niveles de CO₂ y la aplicación o no de CK (C.K), entre los niveles de CO₂ y las diferentes dosis de nitrógeno (C.N) y entre las dosis de nitrógeno y la adición de CK frente a las plantas control sin CK (K.N).

		CO ₂		<i>P</i>	Citoquinina		<i>P</i>	Nitrógeno		<i>P</i>	<i>Interacciones(P)</i>		
		A	E		0	K		L	H		C.K	C.N	K.N
Antesis													
Área verde (cm ²)	hoja a	23.3	21.3	ns	23.4	21.2	0.02	19.1	25.5	<.001	ns	0.08	ns
	hoja b	18.2	14.8	ns	18.3	14.7	<.001	16.5	17.1	ns	ns	ns	ns
	resto_hojas	6.82	5.6	ns	6.77	5.65	ns	6.28	6.14	ns	ns	ns	ns
	tallo	56.7	53.2	ns	57.1	52.7	0.01	54.1	55.9	ns	ns	0.01	ns
	espiga	35.1	34.6	ns	36.1	33.7	ns	32.0	37.7	0.01	ns	0.02	ns
	parte aérea	140	129	0.02	142	127	0.01	127	142	0.01	ns	0.02	ns
Peso_fresco (g)	hoja a	0.488	0.470	ns	0.502	0.456	0.04	0.388	0.570	<.001	ns	0.05	ns
	hoja b	0.434	0.373	ns	0.437	0.371	0.01	0.371	0.436	0.01	ns	ns	ns
	resto hojas	0.264	0.258	ns	0.284	0.239	0.06	0.255	0.268	ns	ns	ns	ns
	tallo	4.67	4.44	ns	4.74	4.37	0.03	4.48	4.62	ns	ns	0.01	ns
	espiga	1.70	1.83	ns	1.74	1.79	ns	1.62	1.91	0.01	0.03	<.001	ns
	parte aérea	7.55	7.29	ns	7.70	7.14	0.05	7.11	7.73	0.03	ns	0.01	ns
Peso seco (g)	hoja a	0.132	0.130	ns	0.140	0.125	0.05	0.109	0.152	<.001	ns	0.02	ns
	hoja b	0.107	0.0923	ns	0.106	0.0932	0.01	0.0951	0.104	0.05	ns	0.05	ns
	resto hojas	0.102	0.0938	ns	0.099	0.0962	ns	0.0968	0.0988	ns	ns	0.06	ns
	tallo	1.35	1.24	ns	1.34	1.21	0.04	1.33	1.21	0.07	ns	0.01	ns
	espiga	0.448	0.492	ns	0.457	0.483	ns	0.447	0.492	ns	0.06	<.001	ns
	parte aérea	2.08	2.02	ns	2.14	1.96	ns	2.07	2.03	ns	ns	0.01	ns
Humedad (%)	hoja a	72.8	72.2	0.01	72.7	72.4	ns	71.7	72.9	0.01	ns	ns	ns
	hoja b	75.4	75.1	ns	75.8	74.8	ns	74.4	76.1	0.01	0.08	ns	ns
	resto hojas	60.2	63.3	ns	64.6	58.7	0.05	61.9	61.3	ns	ns	ns	ns
	parte aérea	72.6	71.8	ns	72.7	71.8	ns	70.9	73.5	0.01	ns	0.08	ns
LMA (g m ⁻²)	hoja a	57.3	60.7	0.01	57.0	60.1	ns	57.7	61.3	0.06	ns	ns	ns
	hoja b	58.7	64.3	ns	57.9	65.0	0.07	60.1	62.9	ns	ns	0.05	ns
	resto hojas	168	156	ns	150	174	0.08	152	172	ns	ns	0.05	0.05
Pf:área (mg cm ⁻²)	hoja a	20.8	21.8	0.05	21.3	21.2	ns	20.2	22.3	0.01	ns	ns	0.07
	hoja b	23.9	25.8	ns	23.9	25.7	0.06	23.5	26.2	0.01	ns	0.03	ns
	resto hojas	46.1	47.6	ns	41.9	51.8	ns	46.1	47.6	ns	ns	ns	ns

Tabla 4.2.13 (continuación)

		CO ₂			Citoquinina			Nitrógeno		<i>Interacciones(P)</i>			
		A	E	<i>P</i>	0	K	<i>P</i>	L	H	<i>P</i>	C.K	C.N	K.N
18 días después de antesis													
Área verde (cm ²)	hoja a	20.7	17.9	ns	20.3	18.3	0.08	16.3	22.3	< 0.01	ns	ns	ns
	hoja b	14.1	9.24	ns	13.3	10.1	0.05	11.1	12.3	ns	ns	ns	ns
	resto_hojas	3.16	1.75	ns	3.41	1.50	0.06	2.80	2.11	ns	ns	ns	ns
	tallo	55.2	50.7	0.02	56.1	49.7	0.01	51.4	54.5	ns	ns	ns	ns
	espiga	29.8	27.8	ns	28.3	29.3	ns	27.2	30.4	0.04	0.06	0.04	ns
	parte aérea	123	106	0.06	121	108	0.02	109	121	0.03	ns	ns	ns
Peso_fresco (g)	hoja a	0.445	0.427	ns	0.466	0.406	0.04	0.357	0.515	< 0.01	ns	ns	ns
	hoja b	0.353	0.269	ns	0.345	0.277	0.04	0.285	0.337	ns	ns	ns	ns
	resto hojas	0.159	0.109	0.05	0.154	0.113	0.01	0.124	0.144	ns	ns	ns	ns
	tallo	4.51	4.22	0.06	4.52	4.17	0.06	4.23	4.46	ns	0.01	ns	ns
	espiga	2.32	1.98	ns	2.12	2.19	ns	2.25	2.05	ns	ns	0.03	ns
	parte aérea	7.73	6.98	0.05	7.60	7.11	ns	7.23	7.48	ns	0.04	0.05	ns
Peso seco (g)	hoja a	0.115	0.109	ns	0.115	0.109	ns	0.0962	0.128	< 0.01	ns	ns	ns
	hoja b	0.0826	0.065	0.01	0.0772	0.0709	ns	0.0723	0.0758	ns	0.01	ns	ns
	resto hojas	0.0693	0.051	ns	0.0629	0.0578	ns	0.0674	0.0533	0.06	0.08	0.05	ns
	tallo	1.44	1.39	ns	1.48	1.34	0.07	1.49	1.34	0.05	0.01	0.06	ns
	espiga	0.783	0.680	ns	0.726	0.738	ns	0.799	0.664	ns	ns	0.04	ns
	parte aérea	2.48	2.30	ns	2.47	2.32	ns	2.52	2.26	0.07	0.02	0.02	ns
Humedad (%)	hoja a	73.9	74.2	ns	75.2	72.9	0.01	73.1	74.9	0.01	0.05	ns	ns
	hoja b	76.1	74.1	ns	77.1	73.2	0.03	74.0	76.3	ns	ns	ns	ns
	resto hojas	54.6	49.8	ns	58.7	45.7	0.01	51.6	52.8	ns	ns	ns	ns
	parte aérea	68.2	67.1	ns	67.7	67.5	ns	65.4	69.8	< 0.01	0.07	ns	ns
LMA (g m ⁻²)	hoja a	55.9	61.2	ns	57.1	60.1	0.06	58.3	58.9	ns	ns	ns	ns
	hoja b	62.1	77.3	ns	60.8	78.7	0.02	66.6	72.9	ns	ns	ns	ns
Pf:área (mg cm ⁻²)	hoja a	21.4	23.8	ns	22.2	23.1	ns	22.0	23.2	0.04	ns	ns	ns
	hoja b	26.4	33.9	ns	28.4	31.9	ns	29.4	31.3	ns	ns	ns	ns
Madurez													
Peso seco (g)	glumas	0.658	0.653	ns	0.634	0.677	ns	0.662	0.649	ns	ns	ns	ns
	grano	1.06	1.07	ns	1.14	0.997	ns	1.16	0.971	ns	ns	ns	ns
	tallo,hojas	1.01	1.12	ns	0.987	1.14	0.07	1.17	0.958	0.02	ns	ns	ns
	parte aérea	2.73	2.85	ns	2.76	2.82	ns	3.00	2.58	0.02	ns	ns	ns

Resultados

Por último, el enriquecimiento en CO₂ de la atmósfera aumentó el Pf:A en la hoja **a**. También aumentó con la aplicación de más nitrógeno en la hoja **a** y, solamente con CO₂ elevado, en la hoja **b** - no mostrado -. La aspersion con CK aumentó igualmente el Pf:A en la hoja **b** (Tabla 4.2.13).

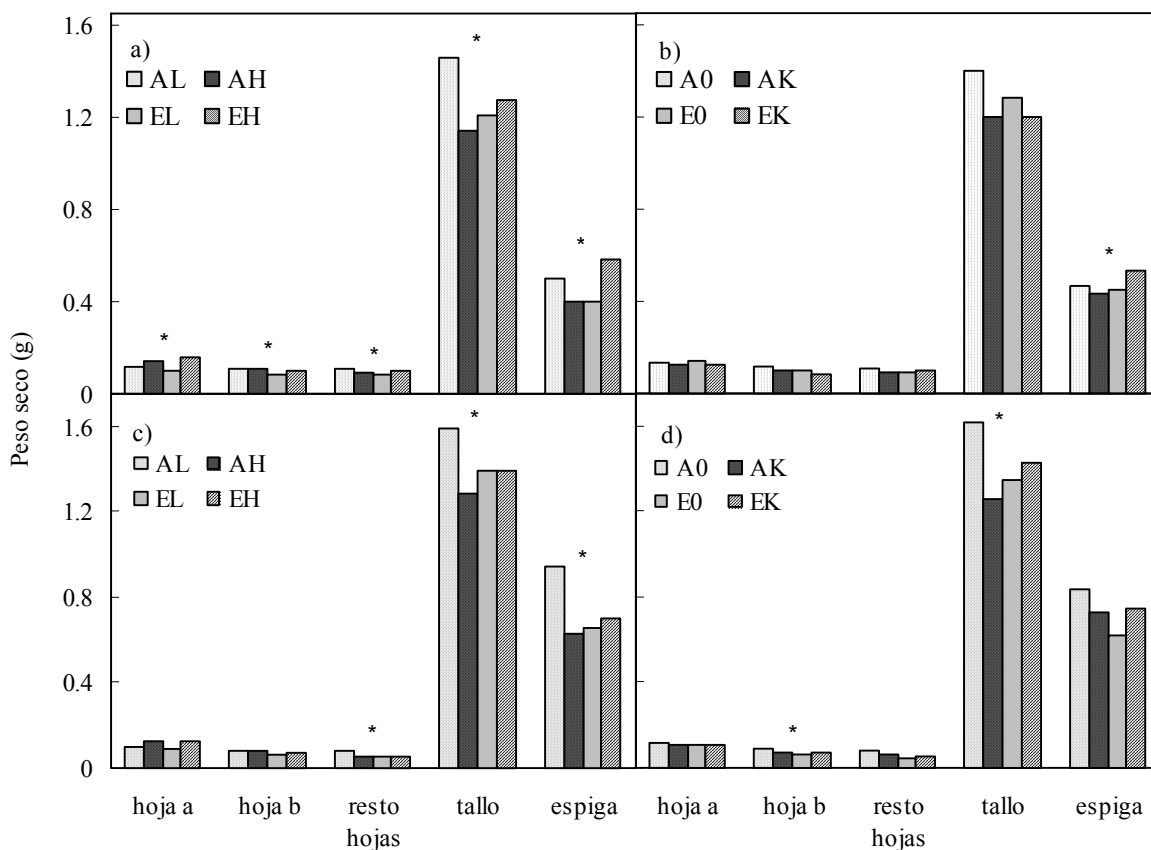


Figura 4.2.19 Influencia del CO₂ de crecimiento - a, c) CO₂ ambiente; b, d) CO₂ elevado -, el nitrógeno - L, dosis baja; H, dosis alta - y la CK - 0, control; K, aspersion con la hormona - sobre el peso seco de las distintas partes de la planta de trigo, en la antesis (a, b) y la postantesis avanzada - 18 dda - (c, d) en el experimento de 2007. Los asteriscos representan diferencias significativas - véase la Tabla 4.2.13 -.

Después de la antesis - 18 dda - el CO₂ elevado redujo el área en todos los órganos, alcanzando significación en el tallo, en el total de la parte aérea (Tabla 4.2.13) y en la espiga de las plantas que no recibieron CK o que tuvieron un suministro bajo de nitrógeno. El área de la espiga aumentó con la mayor dosis de nitrógeno si las plantas crecían en CO₂ elevado, pero no con CO₂ ambiente - interacciones no mostradas -. La CK provocó también una disminución del área en la hoja **b**, el resto de hojas, el tallo y el total de la parte aérea (Tabla 4.2.13, Fig. 4.2.17 d).

Continuó observándose el descenso de los pesos frescos producido por el CO₂ alto, que alcanzó significación en el resto de hojas (Tabla 4.2.13) y, sin aplicación de CK, en el tallo y el total de la parte aérea. Con aplicación de nitrógeno en dosis baja, el CO₂ elevado disminuyó también el peso fresco de la espiga y de toda la parte aérea. La CK disminuyó el peso fresco de los tres grupos de hojas con ambas concentraciones de CO₂ de crecimiento; y el peso fresco del tallo y total de la parte aérea en plantas que crecieron en CO₂ ambiente, pero no en CO₂ elevado. Una dosis abundante de nitrógeno aumentó el peso fresco de la hoja **a** y tendió a producir el mismo efecto en la hoja **b** (Tabla 4.2.13). El mayor aporte de nitrógeno disminuyó el peso fresco de la espiga con CO₂ ambiente y lo aumentó con CO₂ elevado; con menos significación, este efecto se produjo también en el total de la parte aérea.

Los únicos efectos significativos del CO₂ elevado en el peso seco (Tabla 4.2.13) fueron disminuciones en la hoja **b** en plantas control sin CK y, en la espiga y parte aérea con nitrógeno escaso (Fig. 4.2.19 c, d), aunque en otras partes de la planta se observó la misma tendencia a disminuir el peso en CO₂ elevado (Tabla 4.2.13). La CK redujo el peso seco de la hoja **b**, el tallo y el total de la parte aérea en CO₂ ambiente y no en elevado (Fig. 4.2.19 c, d). El nitrógeno abundante aumentó el peso seco de la hoja **a** (Tabla 4.2.13) y tendió a aumentar el de la **b**, pero en CO₂ ambiente y no en CO₂ elevado, disminuyó el del tallo, el del resto de las hojas, el de la espiga y de la parte aérea (Fig. 4.2.19 c). La aspersion con CK disminuyó el %H de las hojas **a**, **b** y restantes (Tabla 4.2.13), pero en la hoja **a** el efecto fue significativo sólo en CO₂ elevado. El nitrógeno, en cambio, elevó el %H de la hoja **a** y de la parte aérea (Tabla 4.2.13).

El LMA no fue modificado por el CO₂ de crecimiento ni las diferentes dosis de nitrógeno. La CK elevó el LMA de forma significativa en las hojas **a** y **b** (Tabla 4.2.13). En el caso del resto de hojas, al haber una gran reducción del área verde en esta fase avanzada del crecimiento, el cálculo del LMA no resultó fiable y no se incluye en la tabla. El Pf:A sólo fue modificado por el aporte de nitrógeno abundante, que lo elevó en la hoja **a** (Tabla 4.2.13).

En la madurez, el CO₂ no tuvo un efecto significativo en el peso seco y el aumento del peso de tallo generado por CK se produjo en tallos y hojas (P=0.065) y en las glumas (ns), por lo que la acción de esta hormona en el crecimiento fue similar a la del año anterior y solo aumentó el peso de las partes vegetativas de la espiga sin traducirse en más cosecha de grano. La mayor dosis de nitrógeno redujo el peso seco del tallo y hojas, lo que hizo que

Resultados

también fuera menor el peso seco de la parte aérea (Tabla 4.2.13). El índice de cosecha, al igual que en 2006, no se vio afectado por ningún tratamiento de forma significativa - no mostrado -.



5. Discusión

5.1. ACLIMATACIÓN AL CO₂ ELEVADO EN EL DOSEL VEGETAL, CON DOS SUMINISTROS DE NITRÓGENO (AÑO 2003)

5.1.1. Intercambio gaseoso

La respuesta directa o a corto plazo de A al CO₂, esto es, la producida por una duplicación instantánea de la [CO₂], fue un aumento del 47 al 117 % - dependiendo del nivel foliar y la dosis de nitrógeno recibida - (Tabla 4.1.2), que confirma muchos estudios anteriores (García *et al.*, 1998; Del Pozo *et al.*, 2005 y revisión de Ainsworth, & Rogers, 2007). El aumento de la fotosíntesis debido a una elevación del CO₂ se explica por dos propiedades de la Rubisco. Primera, que la constante de Michaelis-Menten o Km de la enzima para el CO₂ es alta y está próxima a las [CO₂] actuales en la atmósfera, de modo que el aumento de estas concentraciones estimula la velocidad de carboxilación. Segunda, que el CO₂ inhibe competitivamente la reacción de oxigenación, que conduce a una pérdida de CO₂ en la fotorrespiración (Caemmerer, 2000). En base a las propiedades cinéticas de la Rubisco y a la relación existente entre la [CO₂] dentro de las hojas (C_i) y en el aire exterior (Wong *et al.*, 1979), se ha estimado que un aumento del CO₂ de 370 a 700 μmol mol⁻¹ puede aumentar la fotosíntesis limitada por la actividad Rubisco un 63 %, y la limitada por regeneración de RuBP un 12 % (Long *et al.*, 2004). Los aumentos encontrados en nuestro estudio son similares o mayores que los estimados teóricamente, pudiendo deberse las disparidades a las variaciones en la relación entre C_i y la concentración externa de CO₂.

Por su parte, la respuesta directa de g_s al CO₂ elevado fue una disminución de hasta el 31 % (Tabla 4.1.2), una respuesta que se conoce desde hace tiempo (Heath, 1948). Muchos estudios indican que las células oclusivas responden al CO₂, principalmente al C_i cerrando el poro del estoma. Esta respuesta entraña una compleja y no bien conocida red de señalización modulada por estímulos ambientales y con múltiples componentes (Ainsworth, & Rogers, 2007), red en la que puede estar implicada la fotosíntesis en el mesófilo (Wong *et al.*, 1979; Mott, 2009). Experimentos empleando plantas transformadas con ARN mensajeros anti-sentido que reducen la expresión de Rubisco han demostrado, sin embargo, que la g_s es independiente de la velocidad de fotosíntesis (Caemmerer *et al.*, 2004; Ainsworth, & Rogers, 2007), como han mostrado otros estudios (Del Pozo *et al.*, 2005). En base a estas observaciones se ha propuesto que g_s no está controlada por la capacidad fotosintética, sino más bien por el transporte fotosintético de electrones o sus productos finales (Mott, 2009). La disminución de g_s en respuesta al aumento de CO₂ resulta más que

compensada por el aumento del sustrato para la carboxilación, de forma que, a corto plazo, el CO₂ elevado estimuló la fotosíntesis (Tabla 4.1.2).

En contraste con el efecto directo expuesto en el párrafo anterior, el efecto de aclimatación (Tabla 4.1.2) indica que el CO₂ elevado provocó una regulación negativa o disminución de la capacidad fotosintética, de acuerdo con estudios precedentes (Stitt, 1991; Sage, 1994; Drake *et al.*, 1997; Stitt & Krapp, 1999; Martínez-Carrasco *et al.*, 2005). También redujo la Chl a+b (Fig. 4.1.2) y la A.R.I (Fig. 4.1.3 a, b), como se ha documentado ampliamente (Drake *et al.*, 1997). La incapacidad para mantener a largo plazo el aumento inicial de la fotosíntesis en CO₂ elevado se ha mostrado que se debe casi enteramente a la disminución de la actividad Rubisco (Rogers & Humphries 2000). Esta disminución de la capacidad fotosintética se observó tanto en la hoja **a** como en el resto de niveles foliares, encontrándose un gradiente de mayor a menor A entre los estratos, bajo ambas [CO₂] (Fig. 4.1.1). Además, el grado de aclimatación en las hojas **b** y **c** fue más pronunciado con aporte escaso de nitrógeno (Tabla 4.1.2) ya que tuvieron menores respuestas de aclimatación que las que recibieron un aporte abundante. Adicionalmente, con la mayor dosis de nitrógeno, las respuestas de aclimatación tanto de A como de g_s, fueron menos pronunciadas en las hojas inferiores que en la hoja **a** (Tabla 4.1.2), lo que contrasta con trabajos previos (Osborne *et al.*, 1998, Adam *et al.*, 2000). En cambio, con deficiencia de nitrógeno la aclimatación fue mayor en niveles inferiores del dosel vegetal que en la última hoja.

5.1.2. Actividad Rubisco, contenidos de nitrógeno y clorofila

Las relaciones de A con el contenido de clorofila y actividad Rubisco, para todas las combinaciones de CO₂ y fertilización nitrogenada en todas las hojas del dosel vegetal (Fig. 4.1.5 a, b), sugieren que la pérdida de capacidad fotosintética en plantas crecidas en CO₂ elevado, así como el gradiente en la fotosíntesis dentro del dosel vegetal, se debieron a un descenso de la disponibilidad de los recursos en la planta. La fotosíntesis, Chl a+b, A.R.T, %N y N_A, tanto en la última hoja como en hojas inferiores, aumentaron con el suministro de nitrógeno (Tabla 4.1.1, Fig. 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3 y 4.1.4), y el segundo y tercero de estos parámetros se relacionaron significativamente con N_A (Fig. 4.1.5 c, d), como se ha mostrado previamente (Evans *et al.*, 1993; Osborne *et al.*, 1998). Esto sugiere que la pérdida de nitrógeno fue la causa de la aclimatación de la fotosíntesis. Además, la menor aclimatación al CO₂ elevado en las hojas inferiores en sombra que en las superiores iluminadas con

abundancia de nitrógeno (Tabla 4.1.2), se asoció con un menor descenso en el contenido de N_A de las hojas en posiciones inferiores, cuando se compararon con plantas crecidas en CO_2 ambiente (Fig. 4.1.4 a). Aunque la adición de más nitrógeno aumentó el contenido de nitrógeno en la parte aérea, en CO_2 elevado la abundancia de este elemento no aumentó la asignación de este nutriente a las hojas como lo hizo con CO_2 ambiental (Fig. 4.1.4 c), lo que está de acuerdo con estudios previos (Makino *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 2005). Por tanto, la abundancia de nitrógeno no previno la aclimatación de la fotosíntesis, en particular la de las hojas iluminadas. Con CO_2 alto no solo hubo menos nitrógeno en la parte aérea, también se modificó la distribución entre órganos, ya que se asignó menos nitrógeno a las hojas superiores y hubo más cantidad destinada al tallo y la espiga (Fig. 4.1.4 c). Este último hecho podría deberse a que el CO_2 elevado acelera indirectamente el desarrollo (Long *et al.*, 2004), y así disminuiría el nitrógeno en las hojas y lo aumentaría en los sumideros. Sin embargo, las hojas senescentes también deberían tener menos nitrógeno y esto no ocurrió, lo que lleva a la conclusión de que el CO_2 modificó la partición del nitrógeno entre órganos.

Aunque la aclimatación de la fotosíntesis en CO_2 elevado se ha atribuido a la represión de la expresión génica de la Rubisco por acumulación de azúcares (Krapp *et al.*, 1993; Drake *et al.*, 1997), otros estudios han sugerido que los azúcares solubles no son los responsables de dicha aclimatación (Stitt & Krapp, 1999; Pérez *et al.*, 2005), proponiéndose que cambios en la ontogenia foliar (Ludewig & Sonnewald, 2000) o la limitación en nitrógeno (Nakano *et al.*, 1997; Stitt & Krapp, 1999; Pérez *et al.*, 2005) puedan ser los causantes. La acumulación de azúcares no explica tampoco el descenso del N_A ni la menor absorción de nitrógeno en plantas crecidas con CO_2 elevado en nuestro estudio y en otros precedentes (Nakano *et al.*, 1997; Polley *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001; McDonald *et al.*, 2002; Gloser *et al.*, 2002). Se requieren alternativas que expliquen los bajos contenidos de nitrógeno que provocan la aclimatación de la fotosíntesis en condiciones de CO_2 alto.

El CO_2 elevado disminuyó la g_s - como se deduce de los descensos de la respuesta neta (Tabla 4.1.2) -, igual que en otros estudios (Drake *et al.*, 1997; Lodge *et al.*, 2001; Medlyn *et al.*, 2001; Tezara *et al.*, 2002), y como consecuencia, E también se redujo (Tabla 4.1.1, Fig. 4.1.1 e, f), al igual que el nitrógeno total en la planta (Fig. 4.1.4 b). El contenido de nitrógeno de las hojas en diferentes posiciones del dosel vegetal, niveles de CO_2 de crecimiento y aportes de nitrógeno mostró una relación positiva con la E (Fig. 4.1.6), como se ha observado previamente en distintos estudios (Conroy & Hocking, 1993; Polley *et al.*, 1999; McDonald *et al.*, 2002). Además, con déficit de presión de vapor bajo, se ha

Discusión

observado que el efecto positivo del CO₂ elevado en el crecimiento y la fotosíntesis de las plantas desapareció y el contenido de proteínas solubles disminuyó, al tiempo que se redujo la E (De Luis *et al.*, 2002). Se ha planteado si el descenso de la transpiración conduce a una disminución del nitrógeno en la planta, o si más bien la reducción de la capacidad fotosintética - manifestada por el menor contenido de nitrógeno foliar - disminuye g_s y E (Taub & Wang, 2008). Un estudio de la velocidad de absorción de nitrógeno mostró que la transpiración por unidad de masa de raíz disminuyó en CO₂ elevado y se relacionó positivamente con la absorción de nitrógeno por gramo de raíz (McDonald *et al.*, 2002). La transpiración podría facilitar la absorción de nitrógeno, al aumentar el flujo de masas en la vecindad de las raíces, de modo que el descenso en los niveles de nitrógeno en las plantas expuestas al CO₂ alto podría atribuirse, al menos en parte, a un descenso de su transpiración (Conroy & Hocking, 1993, McDonald *et al.*, 2002; Kanemoto *et al.*, 2009). La evidencia obtenida en nuestros experimentos apoya esta conclusión.

5.2. ANÁLISIS DEL PAPEL DEL NITRÓGENO Y LA CITOQUININA EN LA ACLIMATACIÓN AL CO₂ ELEVADO (AÑOS 2006 Y 2007)

5.2.1. Experimento de 2006

5.2.1.1 Intercambio gaseoso

La respuesta directa o a corto plazo de A al CO₂ en los distintos estratos foliares y dosis de nitrógeno y CK, fue un aumento del 90 % al 390 % (Tabla 4.2.2), reflejando al igual que en 2003 un efecto positivo sobre la A de la duplicación instantánea de la [CO₂], que se debe a las propiedades de la Rubisco - ya señaladas en el apartado 5.1 -. Los valores próximos o mayores que 1 de las respuestas directas de g_s al CO₂ elevado (Tabla 4.2.2) indican que a corto plazo no hubo cierre de estomas debido al CO₂ alto. El cierre de estomas producido al elevar el CO₂ atmosférico, aunque se observa en multitud de estudios, no es una respuesta universal (Morrison, 1998), existiendo algunos experimentos que muestran incrementos de la g_s con 1000 μmol mol⁻¹ de CO₂ o concentraciones superiores (Mackowiack & Wheeler, 1996; Wheeler *et al.*, 1999) y también variaciones a lo largo del desarrollo. Dicha variabilidad en la respuesta de las g_s al CO₂ depende de las especies vegetales (Saxe *et al.*, 1998), habiendo linajes evolutivos - como los helechos - más insensibles que otros (Brodribb *et al.*, 2009); y también depende de las condiciones ambientales de crecimiento (Talbot *et al.*, 1996; Bunce, 2004). En experimentos con diferentes especies y regímenes hídricos, cuando se aplicó un riego escaso la respuesta típica de la g_s al CO₂ alto desapareció en algunas de ellas (Volk, 2000), ya que la sensibilidad del estoma al CO₂ es muy dependiente del estatus hídrico del vegetal (Vavasseur & Raghavendra, 2005). Además al comparar plantas con diferentes [CO₂] puede que aparezcan incrementos de la g_s atribuidos al CO₂ alto, pero que en realidad se deban a diferencias en el estado hídrico de la planta causados por el CO₂ (Rogers *et al.*, 1984; Morrison, 1998).

El nitrógeno mejoró la respuesta directa al CO₂ de la A en las hojas **a** y **c**, pero disminuyó la respuesta directa de g_s en todos los estratos foliares (Tabla 4.2.2). Que la respuesta de A, pero no la de g_s, al aumento instantáneo del CO₂ sea más positiva con mayor disponibilidad de nitrógeno, indica que este nutriente aumentó no tanto la difusión del CO₂ hasta el cloroplasto como la capacidad de carboxilación. Esto se debe a que una fracción mayoritaria del nitrógeno de las hojas se invierte en proteínas fotosintéticas (Evans, 1989; Hikosaka, 2004), incluyendo las que integran el aparato de captación de la luz y las que catalizan la

Discusión

fijación del CO₂ y la regeneración de RuBP. Con más aporte nitrogenado, la respuesta directa de la g_s próxima a 1 (Tabla 4.2.2) muestra que la g_s fue similar con CO₂ ambiente y elevado; con nitrógeno escaso la respuesta directa de la g_s fue un aumento que varió del 4 % al 72 % (Tabla 4.2.2). El efecto más positivo del aumento instantáneo del CO₂ en la g_s de plantas con aporte bajo de nitrógeno que con aporte alto (Tabla 4.2.2) sugiere que la deficiencia de este nutriente invirtió la sensibilidad de los estomas al CO₂, que se hizo positiva. Otros estudios han mostrado que los cambios en el estado hídrico y nutricional pueden modificar la respuesta de los estomas al CO₂ (Norby *et al.*, 1999; Lodge *et al.*, 2001).

La adición de CK modificó el efecto directo del CO₂ elevado sobre A y g_s de una manera dependiente del aporte de nitrógeno, disminuyendo este efecto en plantas con aporte bajo de nitrógeno y estimulándolo o no modificándolo con aporte alto (Tabla 4.2.2). Este resultado implica que la limitación inducida por la baja nutrición nitrogenada restringió el uso de la CK para responder al CO₂ elevado, lo que sugiere que con poco nitrógeno un nivel elevado de CK puede ser desfavorable para la actividad fotosintética, de acuerdo con los resultados de Yong *et al.* (2000), que encontraron con CO₂ alto una mayor concentración de CK endógenas en el xilema cuando el suministro de nitrógeno era bajo. De este modo la deficiencia de nitrógeno produjo mayores niveles internos de CK que junto con la adición exógena de la hormona, originaron en esas plantas niveles supraóptimos capaces de afectar negativamente a la fotosíntesis. En apoyo de esta noción, Gaudino y Pikaard (1997) observaron que la actividad del promotor para la subunidad pequeña de la Rubisco se redujo por acción de niveles supraóptimos de CK.

La respuesta de aclimatación al CO₂ elevado fue diferente en plantas provistas con bajo que con alto suministro de nitrógeno (Tabla 4.2.2, Fig. 4.2.1). En las primeras el crecimiento prolongado en CO₂ elevado provocó la disminución de capacidad fotosintética ya encontrada en el experimento de 2003 y en muchos estudios anteriores, asociada con reducciones de la concentración de Rubisco (Rogers & Humphries, 2000; Long *et al.*, 2004; Ainsworth & Long, 2005). Con más nitrógeno se redujo la aclimatación de A y g_s al CO₂ alto en todas las hojas del dosel vegetal, hasta el punto de que en la hoja **a** no hubo aclimatación negativa, sino positiva (Tabla 4.2.2, Fig. 4.2.1), como se observa en otros estudios con trigo, donde la aclimatación fue más fuerte en hojas inferiores que en la hoja **a** y también fue mayor con deficiencia de nitrógeno (Osborne, 1998; Adam *et al.*, 2000; Long, 2004). La diferente respuesta de aclimatación con deficiencia y amplitud de nitrógeno

implica que la disminución de capacidad fotosintética se debe a una limitación de la disponibilidad de nitrógeno inducida en las hojas por el crecimiento en CO₂ elevado (Kanemoto *et al.*, 2009). De hecho, en otros experimentos con plantas crecidas en cámara de crecimiento en macetas de gran tamaño (16 l) y suministro amplio y frecuente de nutrientes, no se observó regulación negativa de la fotosíntesis por el CO₂ elevado (Geiger *et al.*, 1999; Alonso *et al.*, 2009), como sucede en la hoja **a** de las plantas con abundancia del nutriente.

La aplicación de CK tuvo - como en la respuesta directa - un efecto en la respuesta de aclimatación de A y g_s al CO₂ elevado que fue negativo con suministro bajo del nutriente y positivo - salvo en la hoja **b** - con suministro alto (Tabla 4.2.2), mostrando de nuevo la interrelación entre nitrógeno y CK en su efecto sobre el intercambio gaseoso de las hojas (Yong *et al.*, 2000). Esta interrelación se ha observado también entre la absorción de nitrógeno del suelo y la concentración endógena de CK (Collier *et al.*, 2000). A su vez, el transporte de CK desde la raíz al tallo, así como la aplicación de CK exógena, inducen la expresión de Nitrato-reductasa en las hojas (Samuelson *et al.*, 1995) y aumentan la absorción de nitrógeno por las raíces (Simpson *et al.*, 1982), aunque el aumento inducido en la concentración de aminoácidos puede regular negativamente dicha absorción (Collier *et al.*, 2003).

La notable disminución del intercambio gaseoso inducido por la aplicación de más nitrógeno en plantas de CO₂ ambiente, pero no de CO₂ elevado (Fig. 4.2.1), podría revelar una toxicidad del nutriente en dosis alta. Sin embargo, con aplicación alta de nitrógeno el %N en las hojas no fue inferior en CO₂ elevado que ambiente. La disminución de la humedad foliar (%H) al aumentar el aporte de nitrógeno en plantas crecidas con CO₂ ambiente y no con CO₂ elevado (Fig. 4.2.18 b) sugiere un aumento del déficit hídrico que limita la g_s y el intercambio gaseoso (Fig. 4.2.1). Este déficit pudo deberse al aumento del área de las hojas y otras partes de la planta con mayor aporte de nitrógeno (Tabla 4.2.12), que, sumado al riego limitado de este experimento, redujo la humedad del suelo en mayor grado que con nitrógeno escaso. La ausencia de este efecto negativo del nitrógeno abundante en plantas crecidas en CO₂ elevado puede explicarse, bien porque la acumulación de azúcares no estructurales en hojas con CO₂ elevado, que está ampliamente documentada (Krapp *et al.*, 1993; den Hertog *et al.*, 1996; Drake *et al.*, 1997; Wolfe *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 1999) incrementó su potencial hídrico, bien porque a largo plazo el CO₂ elevado disminuyó, más que aumentar, g_s , conduciendo a reducciones de la transpiración y mayor

Discusión

conservación del agua edáfica, de acuerdo con investigaciones anteriores (Tezara *et al.*, 2002; Long *et al.*, 2004; Robredo *et al.*, 2007).

Aunque la CK no tuvo un efecto significativo sobre el intercambio gaseoso medido a una misma $[\text{CO}_2]$ (Tabla 4.2.1), sí modificó las respuestas directas y de aclimatación al aumento de CO_2 en la atmósfera, como ya se ha indicado. Dadas las relaciones entre la transpiración y las concentraciones de CK y nitrógeno en las hojas (Dodd *et al.*, 2004) y el debate sobre la aclimatación independiente o paralela de los estomas y el mesófilo al CO_2 elevado (Ball *et al.*, 1987; Morison, 1998; Ainsworth & Rogers, 2007), en este experimento se analizó el efecto de la aplicación de CK en la relación entre g_s y A empleando el modelo de Ball *et al.* (1987). El CO_2 de crecimiento modificó los parámetros de la regresión (Tabla 4.2.4) y por tanto, desacopló la respuesta del mesófilo de la de los estomas (Leakey *et al.*, 2006). Por sí misma, la adición de CK no modificó la g_s para valores dados de A, como indica la regresión de g_s sobre $A \cdot \text{HR}/\text{Ca}$ (Tabla 4.2.4). Pero la CK permitió que las plantas de CO_2 ambiente tuvieran la misma g_s para una A dada que las de CO_2 elevado, mientras que sin CK, la g_s de las primeras fue menor (Fig. 4.2.4) y la respuesta del mesófilo y del estoma al CO_2 no fue en paralelo. Puesto que este cambio se asoció con un aumento de la pendiente de la regresión de g_s sobre $A \cdot \text{HR}/\text{Ca}$, que representa la sensibilidad de los estomas (Ball *et al.*, 1987), debe concluirse que en el presente estudio la CK incrementó dicha sensibilidad en plantas crecidas en CO_2 ambiente, propiciando esta conexión entre la asimilación de CO_2 en el mesófilo y los estomas. En algunas especies de árboles (Lodge *et al.*, 2001; Medlyn *et al.*, 2001) y en trigo a temperaturas ambientales de nuestra zona (Del Pozo *et al.*, 2005), se ha encontrado que los estomas y la asimilación de CO_2 responden en paralelo al CO_2 elevado, pero con temperaturas superiores a las ambientales las respuestas de A y g_s al CO_2 elevado se desacoplan (Del Pozo *et al.*, 2005). Medlyn *et al.* (2001) al analizar la aclimatación al CO_2 en 6 especies arbóreas encontró que A y g_s responden en paralelo, ya que no hubo cambios en los parámetros de la función, excepto en *Phillyrea angustifolia* cuando las plantas sufrieron estrés hídrico, que pudo ser nuestro caso. No obstante los estudios con cultivos herbáceos son menos consistentes, existiendo resultados variables (Leakey *et al.*, 2006).

5.2.1.2 Contenidos de Proteína soluble y Rubisco

El análisis del intercambio gaseoso de las hojas ha mostrado el diferente efecto del crecimiento en CO_2 elevado con aporte bajo y alto de nitrógeno. Esta diferencia se asoció con disminuciones con el CO_2 elevado, y aumentos con la adición de nitrógeno, en el

contenido de proteína Rubisco en las hojas (Tabla 4.2.8), ya sea por unidad de peso o por área, aunque, debido al diseño experimental, el alto umbral exigido para la significación estadística respecto al tratamiento con CO₂; sólo se alcanzó en la hoja inferior de las analizadas en el dosel. Esta asociación entre aclimatación de la fotosíntesis al CO₂ elevado y disminución de la concentración de Rubisco confirma lo observado en un gran número de estudios anteriores (Jacob *et al.*, 1995; Nie *et al.*, 1995a; Van Oosten & Besford, 1995; Makino *et al.*, 1997; Sicher & Bunce, 1997; Cheng *et al.*, 1998; Rogers & Humphries, 2000; Pérez *et al.*, 2005). La similitud de efectos del CO₂ elevado en las concentraciones de proteína Rubisco y proteína soluble total - aunque la significación para esta última pudo variar según la expresión en base al peso o al área foliar - indica que la aclimatación no fue consecuencia de una disminución selectiva de la Rubisco, sino de una reducción general de la proteína soluble, de acuerdo con otras investigaciones (Makino *et al.*, 1997; Sicher & Bunce, 1997; Pérez *et al.*, 2005). Similarmente, la aplicación de más nitrógeno aumentó la concentración de proteína Rubisco principalmente como consecuencia de un incremento de la proteína soluble, pero en las hojas más senescentes, **b** y **c**, aumentó también la Rubisco como fracción de la proteína soluble total (Tabla 4.2.8). La disminución progresiva de Rubisco con la posición de la hoja en el dosel del trigo se corresponde con un aumento en la edad de las hojas formadas secuencialmente, así como del sombreado (Osborne *et al.*, 1998). Nuestros resultados indican que la abundancia de nitrógeno previene la disminución específica de la Rubisco en el curso de la senescencia. En investigaciones anteriores se observó que con deficiencia de nitrógeno la Rubisco disminuye más que otras proteínas en el transcurso de la senescencia, mientras que con nitrógeno abundante, los descensos de Rubisco y otras proteínas solubles fueron similares (Martín del Molino *et al.*, 1995).

Las modificaciones del efecto del CO₂ en el intercambio gaseoso llevadas a cabo por la CK, en interacción con el nitrógeno, no guardaron una relación obvia con cambios en los contenidos foliares de Rubisco y proteína soluble inducidos por esta hormona. Un efecto notable de la aspersion con CK fue disminuir la fracción de la Rubisco en la proteína soluble en todas las hojas del dosel vegetal (Tabla 4.2.8). La generalización de este efecto en el gradiente vertical de las hojas excluye una atribución a cambios en la velocidad de senescencia. La disminución selectiva de la Rubisco puede deberse a una inhibición parcial de su síntesis, o a un aumento de su degradación. Criado *et al.* (2009) observaron que la aplicación de CK invirtió la inhibición de la expresión génica para la subunidad pequeña de la Rubisco inducida por la deficiencia de nitrógeno, mientras que no tuvo efecto en plantas

con nitrógeno suficiente. En cambio, el promotor para esta subunidad se inhibió por acción de niveles supraóptimos de CK (Gaudino & Pikaard, 1997). Así, la disminución de la síntesis de Rubisco parece depender de los niveles de nitrógeno y de CK, pudiendo ser estos últimos demasiado altos en el presente experimento como consecuencia de su aplicación repetida. La reducción relativa de la Rubisco implica un incremento de otras proteínas, pero pocos estudios han abordado el posible aumento selectivo de alguna de ellas, como señalaron Stitt y Krapp (1999).

La CK influyó similarmente sobre la proporción de Rubisco en la proteína soluble de las hojas de todas las posiciones del dosel, pero su efecto en las concentraciones de Rubisco y de proteína soluble fue diferente en la hoja **a** y las inferiores. Los resultados muestran una tendencia general de esta hormona a disminuir la proteína - Rubisco y soluble total - en hojas jóvenes y a aumentarla en hojas más viejas. Durante la senescencia, el nitrógeno y otros nutrientes de las hojas más viejas se movilizan hacia las hojas jóvenes y los órganos reproductivos (Martín del Molino *et al.*, 1995; Jordi *et al.*, 2000). La CK pareció alterar esta pauta y aumentar la retención de compuestos nitrogenados en las hojas de más edad, como se discutirá al tratar de la distribución del nitrógeno entre los diferentes órganos de la planta. En plantas transgénicas de tabaco con síntesis de CK estimulada en las hojas más viejas, se observó el mismo contraste que en nuestro experimento entre hojas jóvenes y viejas en la concentración de proteína y Rubisco (Jordi *et al.*, 2000).

5.2.1.3 Contenidos de nitrógeno

Los efectos del CO₂ elevado en la proteína se correspondieron con los producidos en el nitrógeno total de los diversos órganos de la planta, aunque nuevamente la significación de estos efectos fue débil debido al alto umbral exigido por el diseño estadístico. El CO₂ elevado redujo los contenidos de nitrógeno expresados tanto en base al peso como al área de las diversas partes de la planta (Tabla 4.2.10). La disminución de la fotosíntesis por el crecimiento en CO₂ elevado se asocia siempre con una disminución del contenido de nitrógeno de las hojas (Conroy & Hocking, 1993; Tissue *et al.*, 1993; Delgado *et al.*, 1994; Rogers *et al.*, 1996). Se ha propuesto que la disminución del nitrógeno en plantas crecidas en CO₂ elevado se debe a una dilución del nutriente en la mayor biomasa producida en estas condiciones (Drake *et al.*, 1997; Farage *et al.*, 1998; Stitt & Krapp, 1999; Rogers *et al.*, 2006), porque la absorción de nitrógeno del suelo no aumenta en proporción al incremento de la asimilación de CO₂ (Nie *et al.*, 1995b; Geiger *et al.* 1999). Los contenidos de nitrógeno expresados en base al área no son afectados por una eventual dilución en la

biomasa, y permiten concluir que en nuestro experimento el CO₂ elevado provocó una reducción, y no sólo una dilución de los niveles de este nutriente en las hojas. El estudio de la cantidad de nitrógeno en toda la parte aérea y de la fracción del mismo en los diferentes órganos permite decidir si esa disminución del nutriente en los tejidos obedece a una menor exportación del nitrógeno del suelo o a cambios en la distribución del nutriente entre órganos. El crecimiento con CO₂ atmosférico elevado aumentó ligeramente, más que disminuir, la cantidad total de nitrógeno en la parte aérea (Tabla 4.2.10), lo que excluye, en contraste con el experimento de 2003, una disminución de la absorción del nutriente como la discutida por Taub y Wang (2008). En cambio, el CO₂ elevado redujo la asignación de nitrógeno a las hojas y aumentó su adscripción al tallo y la espiga como en 2003, una redistribución que concuerda con estudios precedentes (Makino *et al.*, 1997; Nakano *et al.*, 1997) y sugiere una aceleración del crecimiento inducida por el CO₂ elevado (Ludewig & Sonnewald, 2000; Long *et al.*, 2004), con la consiguiente movilización del nitrógeno foliar hacia el tallo y la espiga en elongación. Por tanto, un cambio con el CO₂ de crecimiento en la distribución del nitrógeno en la planta, debido a la aceleración del desarrollo, es el causante de la disminución en la concentración de nitrógeno en las hojas jóvenes más activas en la fotosíntesis. En 2006, en contraste con 2003, no hubo una relación significativa entre N_A y E - no mostrado -. Más aún, en 2006 las plantas de CO₂ elevado tuvieron mayor g_s y presumiblemente mayor E, que podría aumentar el flujo de masas y de nitrógeno en el suelo, pero no absorbieron significativamente más nutriente. Similarmente, el nitrógeno abundante en combinación con CO₂ ambiente redujo el intercambio gaseoso y, sin embargo, sí aumentó el contenido de nitrógeno en la planta independientemente de la [CO₂] de crecimiento. Puede que la E tenga un menor papel en la absorción de nitrógeno cuando éste es más abundante en el suelo, como ocurrió en 2006 en comparación con los otros años.

Como cabría esperar, los aumentos de proteína Rubisco y proteína soluble inducidos por la aplicación de más nitrógeno al suelo se correspondieron con aumentos - con variable significación estadística - del contenido de nitrógeno por unidad de peso (%N) y de área (N_A) en todas las partes de la planta. El aumento con la aplicación de más nitrógeno de la concentración del mismo en los tejidos vegetales fue consecuencia de mayor absorción desde el suelo, como indica el incremento en la cantidad total de nitrógeno en la parte aérea de la planta (Tabla 4.2.10). Esta es una respuesta generalizada a la disponibilidad de nutrientes en el medio de la raíz (Pérez *et al.*, 1983). Además, la adición de más nitrógeno alteró la distribución de este nutriente entre órganos, aumentando su asignación a las hojas

Discusión

superiores en detrimento, principalmente, del tallo (Fig. 4.2.13). Esta disminución de la adscripción de nitrógeno al tallo confirma la encontrada en 2003 en la porción del mismo por debajo del último entrenudo (Fig. 4.1.4 c). También se confirma la mayor cuota del nitrógeno total recuperada en la última hoja en CO₂ ambiente, pero, a diferencia con los resultados de 2003 y los de Makino *et al.* (1997), en 2006 la adición de más nitrógeno también aumentó la asignación de nitrógeno a las hojas más jóvenes en CO₂ elevado. Así, el aumento de nitrógeno total en la planta no implica siempre mayor asignación a las hojas más jóvenes, pero la mayor cantidad de nitrógeno total por planta en 2006 que en 2003 (Tabla 4.2.10 y Fig. 4.1.4 b, respectivamente) podría sugerir que, por encima de cierto umbral de nitrógeno en la parte aérea, se adscribe mayor fracción de este nitrógeno a dichas hojas. Esto podría explicar la falta de aclimatación al CO₂ elevado con nitrógeno abundante en 2006, mientras que en otros estudios la aclimatación se observó igualmente (Martínez-Carrasco *et al.*, 2005), o en menor medida (Del Pozo *et al.*, 2005; 2007) con suministro abundante que escaso de nitrógeno. Cabe señalar que la adición de más nitrógeno y el CO₂ elevado tuvieron efectos opuestos, tanto en el reparto del nitrógeno en la planta, como en el nitrógeno foliar.

Los efectos de la CK en los contenidos de nitrógeno fueron generalmente similares a los descritos para los contenidos de proteína soluble y Rubisco. Los contenidos de nitrógeno, tanto el Nt como el expresado en materia seca o %N, así como la distribución del nitrógeno de la parte aérea entre órganos o Nd (Tabla 4.2.10, Fig. 4.2.13) indican que la aplicación de CK - que tendió a aumentar la incorporación de nitrógeno a la parte aérea - aumentó la asignación de este nutriente a las hojas senescentes y, en menor medida, al tallo; esto indica que la hormona aumenta la retención de compuestos nitrogenados en las partes de la planta de más edad, de conformidad con observaciones precedentes (Jordi *et al.*, 2000).

La disminución con el CO₂ elevado del %N encontrada en la antesis persistió hasta la madurez en los granos, las estructuras de la espiga y el tallo y las hojas. Que este efecto en el grano sólo fuera significativo con la aplicación de CK (Fig. 4.2.14) se debió a que con el CO₂ elevado hubo un incremento ligeramente menor en la cantidad de nitrógeno por órgano (Nt), y ligeramente mayor en el peso seco, en plantas con CK que sin ella (Tabla 4.2.10, Tabla 4.2.12). No sólo el %N, sino también el Nt mostró una respuesta al CO₂ en la madurez similar a la observada en la antesis: el crecimiento en CO₂ elevado tendió a aumentar, más que a disminuir, el nitrógeno en los órganos aéreos, confirmando que la absorción del nutriente no disminuyó como en 2003 y en otros estudios - revisados por Taub

y Wang (2008) -. Esto revela que el %N disminuyó en CO₂ elevado como consecuencia de una dilución del nutriente en la materia seca ligeramente mayor en CO₂ elevado que ambiente (Stitt, 1991; Taub & Wang, 2008). La mayor asignación del nitrógeno total a la espiga con CO₂ elevado que se observó en la antesis todavía se observó en la madurez, aunque no alcanzó significación. Los datos de las dos fechas de muestreo en 2006, y su comparación con 2003, sugieren que el crecimiento en CO₂ elevado puede reducir o no el nitrógeno total de la parte aérea en función de su disponibilidad en el medio de la raíz, que probablemente fue mayor en 2006, al haberse aplicado al suelo una mayor cantidad del nutriente. De acuerdo con esto, Makino *et al.* (1997) concluyeron que la estimulación inicial de la absorción de nitrógeno causada por el CO₂ elevado desapareció más tarde por agotamiento del nutriente en el medio.

Los efectos positivos de la adición de más nitrógeno en la concentración de nitrógeno y su cantidad por órgano y en toda la parte aérea, en la madurez (Tabla 4.2.10), fueron similares, en términos generales, a los encontrados en la antesis. Cabe señalar que el nitrógeno total en la parte aérea no llegó a ser significativamente mayor con nitrógeno abundante que escaso, en contraste con lo observado en la antesis. Este cambio se debió a que, en el intervalo entre las dos fases de crecimiento, las plantas adquirieron relativamente menos nitrógeno del suelo con la dosis alta de aplicación del nutriente. Posiblemente, el mayor estrés hídrico padecido por estas plantas, como ya se ha expuesto, limitase su crecimiento - véase más abajo - y absorción del nutriente durante la etapa de crecimiento del grano. La dosis alta de fertilizante nitrogenado cambió también la distribución del nutriente entre órganos, reduciendo su adscripción al grano y aumentando su retención en los órganos vegetativos, de acuerdo con los resultados de Pérez *et al.* (1983), que concluyeron que la espiga tiene una capacidad limitada para acumular nitrógeno.

La CK aumentó la concentración de nitrógeno del grano y las estructuras de la espiga en la madurez con CO₂ ambiente, pero no con CO₂ elevado (Fig. 4.2.14), porque con el primero incrementó Nt sin cambiar apreciablemente el peso, mientras que con CO₂ elevado redujo ligeramente Nt sin efectos en el peso. Aunque el nitrógeno total de la parte aérea fue ligeramente superior en presencia de CK (ns), indicando una mayor absorción del nutriente. Los resultados sobre la cantidad de nitrógeno por órgano y la distribución del nutriente entre órganos (Tabla 4.2.10) indican que con CK existió una menor movilización de recursos desde las partes senescentes hacia los sumideros, tanto en antesis como en la madurez, que podría reflejar un retraso de la senescencia de los niveles foliares más sombreados, los

cuales en condiciones normales reciben progresivamente menos CK con el torrente transpiratorio (Aloni *et al.*, 2005; Boonman *et al.*, 2007).

5.2.1.4 Contenido de clorofila

Las concentraciones foliares de clorofila y nitrógeno están frecuentemente asociadas, como se ha encontrado en el experimento de 2003 (Fig. 4.1.5 c) y en otros estudios (Evans *et al.*, 1993; Osborne *et al.*, 1998; Del Pozo *et al.*, 2007). Las concentraciones de Chl a+b, Chl a y Chl b en las hojas **b** y **c** disminuyeron - con mayor o menor significación estadística - con el aumento de CO₂, como lo hizo el contenido de nitrógeno (Tabla 4.2.6), pero en la hoja **a** la clorofila, a diferencia con el nitrógeno total, no disminuyó con el enriquecimiento del aire en CO₂. Que en esta hoja el nitrógeno, la proteína soluble y la proteína Rubisco disminuyeran con el CO₂ elevado, mientras que la Chl no lo hiciera, parece indicar que hubo un cambio en la distribución del nitrógeno entre procesos fotosintéticos, con mayor asignación a la Chl y a las proteínas de los tilacoides con las que toda ella está enlazada (Markwell *et al.*, 1979). Más aún, la comparación de las Tablas 4.2.6 y 4.2.8 revela que tanto en la hoja **a** como en las inferiores, el CO₂ elevado aumentó la relación entre clorofila y proteína Rubisco, que apunta a una disminución de la capacidad de carboxilación acompañada de un aumento de la capacidad fotoquímica. Este cambio inducido por el CO₂ elevado coincide con el observado en estudios anteriores en condiciones ambientales similares (Pérez *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2009a). Un cambio en el balance entre Rubisco y transporte de electrones con el enriquecimiento en CO₂ de la atmósfera no está de acuerdo con algunos resultados (Sage *et al.*, 1995; Nakano *et al.*, 1997), pero concuerda con las observaciones de Makino *et al.* (1997b), Mitchell *et al.* (2000) y Osborne *et al.* (1998).

En contraste con el enriquecimiento en CO₂, el aumento del suministro de nitrógeno incrementó las concentraciones de Chl en todas las hojas analizadas, de acuerdo con la relación entre ambos parámetros indicada anteriormente. La adición de más nitrógeno no alteró el balance entre Chl y Rubisco o nitrógeno total (Tablas 4.2.6, 4.2.8, 4.2.10) en las dos hojas superiores, pero lo disminuyó en la hoja **c**, probablemente como consecuencia del aumento específico de la Rubisco en las hojas de más edad inducido por el nitrógeno, que antes se ha expuesto.

La respuesta de la concentración de clorofilas a la aplicación de CK, con tendencias a disminuir en las hojas superiores y a aumentar en la hoja **c**, se asemejó a las respuestas de la Rubisco y el nitrógeno foliar, mostrando nuevamente la relación general entre clorofila y

nitrógeno foliares y el efecto de la hormona aumentando la retención en las hojas más viejas de compuestos nitrogenados que propiciaron una concentración más alta de clorofilas. La razón Chl/Rubisco tendió a disminuir con la aplicación de CK sólo en la hoja **b**, sugiriendo menor partición de nitrógeno hacia estos pigmentos; no está clara la causa de esta diferencia. La razón entre Chl y nitrógeno en base al peso seco foliar mostró una disminución con la CK en la hoja **c**, que muestra que la retención del nitrógeno en hojas senescentes inducida por la hormona no aumentó la Chl en esta hoja en proporción con el nutriente.

5.2.1.5 Parámetros de crecimiento

En la antesis del cultivo de 2006, las respuestas de la superficie verde al CO₂ elevado fueron un aumento significativo en la espiga, la misma tendencia en el tallo, y ningún cambio en las hojas (Tabla 4.2.12). El aumento del CO₂ en la atmósfera, por estimular la fijación neta del mismo, puede dar lugar a un aumento del crecimiento y por tanto a mayor velocidad inicial de producción de superficie verde, que a su vez incrementa la fotosíntesis por unidad de superficie de suelo; en cultivos con cobertura completa del suelo por el dosel vegetal, el crecimiento en superficie verde cobra una significación menor (Long *et al.*, 2004). Así, algunos han encontrado que la superficie verde de las plantas aumenta en CO₂ alto, pero principalmente como consecuencia de su duración o persistencia (Mulholland *et al.*, 1997). Por el contrario, se ha observado que a largo plazo el CO₂ elevado no cambia el área foliar por unidad de superficie de suelo (Long *et al.*, 2004; Ainsworth & Long, 2005). La falta de efectos en el área de las hojas en nuestro experimento es coherente con esta observación. El aumento del área de la espiga en la fase de la antesis refleja, probablemente, la mayor precocidad en el crecimiento inducida por el CO₂ elevado; es decir, las espigas tuvieron más área que en CO₂ ambiente porque iniciaron antes la emergencia y la expansión posterior. Esto fue acompañado de una más pronta elongación del último entrenudo del tallo, reflejada en su tendencia a un área mayor (Tabla 4.2.12).

La estimulación del área de todas las partes de la planta con la aplicación de más nitrógeno, en contraste con el CO₂ elevado, confirma el efecto observado en estudios realizados desde tiempo atrás (Pearman *et al.*, 1977). En las hojas más viejas, este efecto del nitrógeno sólo fue positivo en las plantas de CO₂ elevado, posiblemente porque estas hojas están más desprovistas del nutriente que en CO₂ ambiente, como consecuencia de la mayor asignación del mismo al tallo en elongación y la espiga inducida por el CO₂ elevado.

Discusión

La aplicación de CK se ha mostrado que aumenta la superficie foliar, tanto aumentando el número de tallos por planta (Tomkins & Hall, 1991), como la expansión foliar directamente (Ulvskov *et al.*, 1992), de modo no ligado a cambios en la importación o el metabolismo de carbohidratos (Nielsen & Ulvskov, 1992) o en la retención de compuestos nitrogenados, que se había asociado previamente con la CK (Ulvskov *et al.*, 1992). En el experimento de 2006 no se observaron estos efectos positivos de la CK en el área del tallo o las hojas - cuyo área se redujo -, pero sí en la de la espiga de plantas que recibieron la dosis baja de nitrógeno, lo que parece indicar que la hormona aceleró la emergencia y expansión de este órgano, como lo hizo el CO₂ elevado.

La estimulación de la fotosíntesis con el aumento del CO₂ de la atmósfera debería reflejarse en un incremento de la biomasa, pero tuvo sólo un efecto marginal en el peso seco de las dos hojas superiores, con cambios opuestos dependiendo de la aplicación de nitrógeno (Fig. 4.2.18 a). La causa de este efecto negativo, observado con nitrógeno alto, tanto en el peso seco como en el LMA (Fig. 4.2.17 e), no es clara. Aunque la fotosíntesis foliar saturada por la luz aumenta alrededor de un 24 % en CO₂ elevado (Long *et al.*, 2006), como promedio de muchos estudios, la producción de biomasa de un cultivo de trigo aumenta sólo entre 13 y 16 % (Long *et al.*, 2006; Tubiello *et al.*, 2007), que es similar al incremento estadísticamente no significativo encontrado en este estudio. Parte del peso de un órgano es agua; como se ha indicado anteriormente, el CO₂ elevado aumentó el %H en hojas de plantas que recibieron nitrógeno alto, cuyo mayor desarrollo pareció inducir un déficit hídrico en CO₂ ambiente. Un posible aumento del potencial hídrico, por el aumento de la concentración de carbohidratos, o un cierre de los estomas a largo plazo en CO₂ elevado, explicarían este aumento del %H. Se ha observado frecuentemente un aumento de LMA en respuesta al aumento del CO₂ atmosférico (Curtis, 1996; Roderick *et al.*, 1999), en asociación con una acumulación de azúcares no estructurales (Radoglou & Jarvis, 1992; Nie *et al.*, 1995a; Moore *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 2005). A diferencia con dichos antecedentes, en este experimento el CO₂ elevado no alteró el LMA en las hojas jóvenes o más bien lo disminuyó, como en la hoja **b** con nitrógeno abundante (Fig. 4.2.17 e). El aumento del LMA en el resto de las hojas es mayoritariamente consecuencia de que incluye el peso de todas las hojas, incluyendo las que estaban muertas, y sólo el área de las porciones todavía verdes. En cultivos de trigo en condiciones similares a las de este experimento de 2006, se ha encontrado también una disminución del LMA con el incremento de [CO₂] en la atmósfera,

que se ha atribuido a disminuciones en componentes estructurales de las hojas (Gutiérrez *et al.*, 2009b).

El aumento de los pesos fresco y seco de todas las partes de la planta y especialmente en las dos hojas superiores, inducido por la aplicación de una dosis alta de nitrógeno, fue mayor en CO₂ ambiente que elevado (Fig. 4.2.18 a). Este efecto interactivo puede estar relacionado con la menor asignación de nitrógeno a las hojas **a** y **b** inducida por el CO₂ elevado, que pudo limitar el crecimiento de estas hojas. El nitrógeno aumenta el peso como consecuencia, principalmente, del incremento provocado en la superficie verde (Thorne, 1974), que aumenta la fijación de CO₂ y la acumulación de materia seca en toda la planta, y también como consecuencia de la estimulación de la fotosíntesis por unidad de superficie verde. La dosis alta de nitrógeno redujo el %H de las hojas jóvenes, más expuestas a la radiación y con más intercambio gaseoso que las basales, en plantas crecidas en CO₂ ambiente (Fig. 4.2.18 b). La causa de este cambio inducido por el nitrógeno fue, como se ha expuesto anteriormente, el aumento de superficie verde, que estimuló la transpiración del cultivo conduciendo en fases avanzadas del crecimiento, con el riego limitado de este experimento, a mayor agotamiento del agua del suelo que en el cultivo con poco nitrógeno. El CO₂ elevado pudo aliviar este déficit hídrico y la disminución consiguiente del %H por los mecanismos sugeridos anteriormente. El incremento del LMA inducido por la aplicación de más nitrógeno confirma observaciones anteriores de aumentos con el nitrógeno en el grosor, la masa seca por unidad de superficie y la densidad de las hojas (Rademacher & Nelson, 2001; Gutiérrez *et al.* 2009b) debido a un incremento de los compuestos estructurales (Luo *et al.*, 2006; Pitre *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.* 2009b).

La CK redujo el tamaño de la parte aérea, excepto de la espiga, siendo las plantas visualmente más pequeñas. El aumento de la precocidad en la emergencia y expansión de la espiga fue probablemente la causa del incremento del peso de este órgano inducido por la aspersión con CK, que fue paralelo al de su área (Tabla 4.2.12, Fig. 4.2.17 a). Aunque la CK no produjo cambios significativos en el peso de otros órganos, redujo el %H de las hojas **a** y **b**, sugiriendo que este tratamiento aumentó su déficit hídrico. Se ha encontrado que el aumento de concentración de CK en el tallo estimula la g_s y la E en condiciones de baja demanda evaporativa, requiriéndose un aumento en la capacidad de absorción de agua para mantener una transpiración incrementada (Visotskaya *et al.*, 2003). La aplicación exógena de CK aumenta también la E (Dodd, 2003) y de este modo es posible que la aspersión de CK eleve la E, provocando mayor déficit hídrico en fases avanzadas del cultivo, dada la

Discusión

escasez del riego. La Figura 4.2.1 sugiere un aumento de transpiración con la CK, aunque el efecto no alcanzó significación estadística. Al disminuir el área y el %H de las hojas **a** y **b** sin modificar al mismo tiempo el peso seco de las mismas (Fig. 4.2.17 a, b), la CK aumentó el LMA y el Pf:A de estos estratos foliares (Tabla 4.2.12). Así el efecto más acusado de la hormona en hojas jóvenes fue un cambio en la morfología foliar, en cambio, en las partes de la planta con más edad como el tallo o el resto de hojas, la CK no modificó su área ni peso seco (Fig. 4.2.17 a, b).

El aumento de peso seco provocado por el CO₂ elevado observado en la antesis se acrecentó en la madurez, aunque el efecto no alcanzó significación estadística. El transcurso del tiempo con el efecto fertilizante del CO₂ condujo a mayor fijación de carbono y acumulación incrementada de biomasa entre las dos fases del crecimiento. En investigaciones anteriores con condiciones ambientales similares a las de este experimento, la respuesta del peso seco total de la planta al aumento del CO₂ fue también mayor en la madurez que en la emergencia de la espiga (Gutiérrez *et al.*, 2009a). En contraste, en otros estudios el CO₂ elevado aumentó la velocidad de crecimiento en fases juveniles del desarrollo, pero no (Geiger *et al.*, 1998), o en menor medida (Kim *et al.*, 2003) en plantas de más edad, de modo que la mayor biomasa final de las plantas con el enriquecimiento en CO₂ refleja en mayor o menor medida un crecimiento más rápido en una etapa anterior (Geiger *et al.*, 1998). El incremento de alrededor de 30 % en la biomasa total y la producción de grano en la madurez inducido por el CO₂ elevado fue muy similar al encontrado en una revisión de numerosos experimentos con trigo (Amthor, 2001) y otras especies (Kimball, 1983), pero notablemente mayor que en otros estudios con diversas especies (Kim *et al.*, 2003; Long *et al.*, 2006; Tubiello *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2009a). Estas discrepancias se han explicado en buena parte en base a las [CO₂] que se consideran como ambiente y elevada y al tipo de respuesta al CO₂ - lineal o hiperbólica - usada en las estimaciones (Tubiello *et al.*, 2007).

Los efectos en el peso seco de la adición de más nitrógeno observados en la antesis desaparecieron en la madurez (Tabla 4.2.12), lo que sugiere que la duración de la superficie verde después de la antesis se acortó con la dosis alta del fertilizante, limitando la fotosíntesis neta del cultivo. Esta duración, que equivale a la integral de la superficie fotosintética en el intervalo de crecimiento, se ha señalado como un factor determinante de la producción de biomasa de un cultivo (Thorne, 1974). Es posible que el déficit hídrico en las plantas con más nitrógeno, y mayor superficie foliar en la antesis, determinase la menor

persistencia de su área verde después de la antesis. La atenuación de este déficit hídrico con el CO₂ elevado encontrada en la antesis pudo desaparecer, como las diferencias en el intercambio gaseoso (Martínez-Carrasco *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2009a), al avanzar el crecimiento.

El efecto positivo de la aspersion con CK en el peso de la espiga durante la antesis sólo se mantuvo en las estructuras vegetativas de la misma - glumas y raquis - en la madurez (Tabla 4.2.12), sugiriendo que esta hormona no aumentó los asimilados para llenar el grano.

5.2.2. Experimento de 2007

5.2.2.1 Intercambio gaseoso

En el año 2007, a corto plazo el CO₂ elevado ocasionó incrementos sobre la A del 50 % al 164 % en la emergencia de la espiga y del 45 % al 70 % después de la antesis (Tabla 4.2.3), dependiendo de los distintos estratos foliares, dosis de nitrógeno y adición o no de CK. Este efecto directo del CO₂ fue, por tanto, similar al de 2003 y menor que el de 2006, reflejando probablemente cambios en la capacidad fotosintética asociados con el menor contenido de nitrógeno de las plantas que en 2006, como se discutirá después. Pero, al contrario que en este último año, hubo moderados descensos con el CO₂ elevado de la g_s - que fueron más patentes en la etapa posterior a la antesis - (Tabla 4.2.3). Por tanto en 2007 la elevación puntual de la [CO₂] favoreció la carboxilación por la Rubisco, de acuerdo con lo encontrado en los dos años precedentes, y por los motivos ya expuestos. Pero, como en el experimento de 2003 y a diferencia con el de 2006, a corto plazo el CO₂ elevado, indujo un cierre estomático que generalmente fue de mayor magnitud al avanzar el desarrollo. Esta es una respuesta frecuente en la bibliografía, ya citada anteriormente, y muy extendida dentro de la mayoría de las angiospermas (Brodrribb *et al.*, 2009). En la emergencia de la espiga el mayor aporte de nitrógeno favoreció, como en 2006, el efecto del aumento instantáneo del CO₂ en la carboxilación, pero sólo en la hoja **a**, y sin modificar el efecto del CO₂ en la g_s (Tabla 4.2.3). La influencia del nitrógeno no fue, por tanto, en la difusión del CO₂ hasta el cloroplasto, sino en las reacciones del mesófilo, cuyas enzimas aumentan con la disponibilidad del nutriente (Evans, 1989; Hikosaka, 2004). En contraste, la aplicación de más nitrógeno disminuyó en esta fase las respuestas de A y g_s al aumento instantáneo de CO₂ en las hojas **b** y **c**, por efectos en la difusión del CO₂ a través de los estomas, como indica la menor respuesta directa de la g_s al CO₂ con nitrógeno abundante que escaso (Tabla 4.2.3). En la antesis también se produjo este descenso con el nitrógeno, debido a la difusión

Discusión

gaseosa, de la respuesta directa al CO₂, tanto en la hoja **b** como en la **a**, pero sólo en plantas sin CK. Los resultados indican que, a través de un efecto en la apertura de los estomas, esta hormona potenció en fases avanzadas del desarrollo el efecto positivo del nitrógeno en la respuesta directa al CO₂. Además, y excepto con deficiencia de nitrógeno en la antesis, la CK favoreció de por sí la respuesta directa de A al aumento del CO₂, mejorando la respuesta de g_s; aunque no se excluye un posible efecto en la capacidad de carboxilación. Este papel de la CK en la conductancia es coherente con el efecto positivo de los niveles endógenos de la hormona (Visotskaya *et al.*, 2003) y de la aplicación exógena de la misma (Dodd, 2003) en la transpiración.

Las respuestas de aclimatación de A y g_s, menores que 1 con pocas excepciones, (Tabla 4.2.3) en los dos estadios de crecimiento indican que, el CO₂ alto a largo plazo disminuye el intercambio gaseoso, confirmando los resultados de años anteriores y los de otros autores ya citados. Esta aclimatación negativa se minoró en todos los estratos foliares, tanto en la emergencia de la espiga como en la antesis, con el mayor suministro de nitrógeno, indicando como en 2003 y 2006, que la limitación por disponibilidad del nutriente pudo ser la causa del descenso de la capacidad fotosintética con CO₂ elevado, aunque a diferencia del 2006, esta mayor dosis del nutriente no evitó el cierre de estomas, excepto en la hoja **a** de plantas que a la vez recibieron CK. El aumento con CK de la respuesta de aclimatación de A al CO₂ - menor regulación negativa - de la hoja **a** se observó con ambas dosis de nitrógeno en la emergencia de la espiga y con nitrógeno alto después de la antesis, y fue paralelo al efecto de la hormona en la respuesta de aclimatación de g_s, sugiriendo que el primero se debió a una estimulación de la conductancia por parte de la CK, como se ha discutido para la respuesta directa al CO₂. La ausencia de efecto positivo de la CK con nitrógeno escaso en la hoja **a** durante antesis, puede indicar que al avanzar el desarrollo la deficiencia del nutriente fue más acusada, aunque en la hoja **b** se invirtieron las tendencias con el uso de CK, disminuyendo la aclimatación con dosis bajas del nutriente y aumentando si la dosis era superior (Tabla 4.2.3). No está claro por qué la interacción CK x N se invirtió en dichos estratos del dosel, ni por qué la hormona no tuvo, en general, efectos positivos en las hojas inferiores.

La dependencia respecto al nitrógeno del efecto del CO₂ elevado se deduce claramente de la comparación de las respuestas netas al CO₂, que con dosis alta del nutriente fueron mayores que 1 y con dosis baja generalmente menores. La pauta de cambio con la CK en las

respuestas netas de A y g_s al CO_2 no fue, en cambio, constante, impidiendo una generalización sobre su efecto.

El modelo empírico de Ball *et al.* (1987) permite predecir la g_s en base a una función lineal de A , que incluye la $[CO_2]$ y la humedad atmosférica, así como analizar si la sensibilidad del estoma al CO_2 se ha modificado (Leakey *et al.*, 2006; Aisworth & Rogers, 2007). En la emergencia de la espiga del 2007 el crecimiento prolongado con el doble de $[CO_2]$ no modificó la sensibilidad de los estomas y sólo fue significativa una recta común, como se ha puesto de manifiesto en otros estudios (Kellomaki & Wang, 1997, Strassmeyer & Forstreuter, 1997; Liozon *et al.*, 2000). Tampoco fue afectada la regresión por el aporte nitrogenado, indicando que la fotosíntesis y la g_s respondieron en paralelo al CO_2 (Medllyn, 2001). Las diversas regresiones estudiadas, ya sea con todos los datos en su conjunto, o separadamente en cada $[CO_2]$ y hoja del dosel, indican que la aplicación de CK aumentó la g_s para valores dados de $A \cdot Hr/Ca$ (Tabla 4.2.4, Fig. 4.2.5 a), y estimuló la sensibilidad de los estomas al CO_2 , puesto que aumentó la pendiente de la regresión (Tabla 4.2.4, Fig. 4.2.5 b) alcanzando valores incluso superiores a los obtenidos con CO_2 ambiente. En la antesis, en cambio, la CK por sí sola no afectó a la regresión, pero el CO_2 elevado la modificó o no en función de la aplicación de esta hormona (Tabla 4.2.4). Así, la aplicación de CK previno la disminución de g_s para valores dados de A provocada en plantas control por el CO_2 elevado (Fig. 4.2.5 c). Considerados conjuntamente, los resultados de 2006 y 2007 muestran un papel directo de la CK estimulando la conductancia para valores dados de A en fases tempranas del crecimiento - emergencia de la espiga en 2007 -, y un papel indirecto, anulando el cambio en la relación $g_s - A \cdot Hr/Ca$ inducido por el CO_2 elevado, en la antesis de 2006 y 2007.

5.2.2.2 Respuesta de la Fluorescencia de la clorofila

El descenso de $Fv':Fm'$ provocado por el CO_2 elevado con dosis bajas de nitrógeno en la emergencia de la espiga y con ambas dosis de nitrógeno en la antesis (Tabla 4.2.5, Fig. 4.2.6), implica una reducción de la eficiencia en la transferencia de energía de excitación desde la antena hasta el centro de reacción del PSII, que puede superarse en hojas jóvenes, pero no en hojas avanzadas en su crecimiento, con un suministro alto de nitrógeno. Los cambios en $Fv':Fm'$ con el CO_2 elevado en función del nitrógeno se asociaron con las modificaciones de la concentración de clorofila que se discuten más adelante, lo que sugiere

Discusión

aumentos iniciales - hoja **a** en la emergencia de la espiga - del aparato fotoquímico con CO₂ elevado y nitrógeno alto. Las respuestas al CO₂ de la eficiencia fotoquímica que se han encontrado previamente incluyen: (a) sólo cambios pequeños a pesar de una disminución del contenido de Rubisco (Tezara *et al.* 2002); (b) ningún cambio en Fv':Fm' (Habash *et al.*, 1995; Hymus *et al.*, 1999); (c) aumentos tanto en la eficiencia fotoquímica como en la capacidad de carboxilación (Zhang & Dang 2006); y (d) aumentos de la eficiencia fotoquímica junto con disminuciones de la capacidad de carboxilación (Gutiérrez *et al.*, 2009a). A diferencia con Fv':Fm', qP no disminuyó con el CO₂ elevado en plantas con nitrógeno bajo y sí lo hizo con nitrógeno alto, en la emergencia de la espiga (Fig. 4.2.6). En experimentos en condiciones similares a los de este estudio, en la emergencia de la espiga del trigo el CO₂ elevado aumentó Fv':Fm' y disminuyó qP (Martínez-Carrasco *et al.*, 2005). Generalmente, qP se ve mucho más afectado por la capacidad de uso de los productos del transporte de e⁻ que por cambios en la disipación no fotoquímica de la energía de excitación (Baker *et al.*, 2007). Esto sugiere que la capacidad de asimilación de carbono en CO₂ elevado limitó el consumo de NADPH y ATP relativamente más con la aplicación alta de nitrógeno que con la baja, lo que condujo al cierre con la primera de una mayor proporción de centros del PSII, que se relaciona con qP. El aumento con CO₂ elevado de la razón clorofila/Rubisco en esta fase del crecimiento, que se discute después, puede explicar esta limitación relativa de la capacidad de carboxilación frente a la de transporte de e⁻. Después de la antesis, con menor eficiencia fotoquímica máxima con alto [CO₂] en ambas dosis de nitrógeno (Fig. 4.2.8), lo cual redujo la capacidad de formación de productos finales del transporte de e⁻, el uso de éstos no estuvo tan restringido, de modo que la proporción de centros del PSII abiertos fue más alta que con CO₂ ambiente. Las respuestas al CO₂ elevado de Fv':Fm' y qP que se han discutido condujeron a una disminución del rendimiento cuántico del transporte de e⁻ (Φ) en la emergencia de la espiga y a poco cambio o una tendencia a aumentar después de la antesis. La aclimatación fotosintética al CO₂ elevado se ha encontrado en algunos casos que conduce a una disminución de la velocidad de transporte de e⁻ (Spunda *et al.*, 1998; Aranda *et al.*, 2006). Con mayor adición de nitrógeno se puede sintetizar mayor cantidad de componentes del aparato fotosintético (Foyer *et al.*, 1994), aumentando así la eficiencia fotoquímica, como se observó con CO₂ alto en la emergencia de la espiga en asociación con aumentos de la cantidad de clorofila - véase más adelante -. Sin embargo, en plantas con CO₂ elevado, limitadas en la capacidad de asimilación de CO₂, esto fue acompañado de mayor cierre de centros del PSII - disminución de qP - en la emergencia de la espiga.

Los efectos de la CK en la fluorescencia de la clorofila fueron escasos, limitándose a una disminución del rendimiento cuántico de transporte de e^- en la hoja **a** en la emergencia de la espiga (Tabla 4.2.5, Fig. 4.2.7). Esto fue resultado de tendencias a la disminución tanto de $Fv':Fm'$ como de qP (Fig. 4.2.7). No se encontró una relación entre los contenidos de clorofila y estos efectos de la CK, que podrían relacionarse con la tendencia de la hormona a disminuir la concentración de Rubisco, como se discutirá después.

5.2.2.3 Contenidos de Proteína soluble y Rubisco

La disminución de la capacidad fotosintética o aclimatación al CO_2 elevado (Fig. 4.2.2, Fig. 4.2.3) fue probablemente una consecuencia del descenso - con significación variable con la posición en el dosel vegetal, la fase de crecimiento y la expresión por peso o por área - de la concentración de Rubisco (Tabla 4.2.9). Esta asociación confirma la encontrada en 2003 y 2006 y en estudios anteriores (Jacob *et al.*, 1995; Nie *et al.*, 1995a; Van Oosten & Besford, 1995; Makino *et al.*, 1997; Sicher & Bunce, 1997; Cheng *et al.*, 1998; Rogers & Humphries, 2000; Pérez *et al.*, 2005). En conformidad con los resultados de 2006, el efecto del CO_2 elevado en la concentración de proteína Rubisco fue generalmente paralelo al ejercido en la proteína soluble total, lo que implica que la aclimatación fue mayoritariamente consecuencia de una reducción general de la proteína soluble (Makino *et al.*, 1997; Sicher & Bunce, 1997; Pérez *et al.*, 2005). La tendencia a disminuir el %Rubisco en la proteína soluble con CO_2 elevado (Tabla 4.2.9) podría sugerir, sin embargo, una disminución específica de esta enzima, como la reportada como resultado de una inhibición de su expresión génica inducida por acumulación de carbohidratos (Jang & Sheen, 1994; Van Oosten *et al.*, 1994; Nie *et al.*, 1995 b); la débil significación estadística de este efecto recomienda considerarlo con cautela. La acción del nitrógeno disminuyendo la aclimatación al CO_2 elevado se explica igualmente por los aumentos inducidos en la concentración de Rubisco, aunque la mejora de la g_s (Fig. 4.2.2) probablemente contribuyó también (Wang & Kellömaki, 1997), especialmente en la hoja **a** en la emergencia de la espiga, para la cual la dosis alta de nitrógeno no aumentó la cantidad de esta enzima (Figura 4.2.12 b). La abundancia de nitrógeno, de acuerdo con el experimento realizado en 2006, aumentó no sólo la proteína soluble total, sino la proporción de Rubisco en ésta al avanzar el desarrollo foliar - las hojas situadas bajo la **a** en la emergencia de la espiga y las **a** y **b** después de la antesis -, indicando nuevamente que previno la disminución específica de la Rubisco en el curso de la senescencia (Osborne *et al.*, 1998; Martín del Molino *et al.* 1995).

El efecto positivo en la fotosíntesis de la aplicación de CK combinada con nitrógeno alto (Fig. 4.2.2, Fig. 4.2.3) no se relacionó, en cambio, con aumentos de Rubisco, en consonancia con los resultados de 2006. De hecho, en la emergencia de la espiga la aplicación de CK tendió a disminuir la concentración de Rubisco y de proteína soluble en las hojas, especialmente en la **b**. Probablemente la hormona, con nitrógeno alto, mejoró la asimilación de CO₂ a través de efectos en la g_s (Visotskaya *et al.*, 2003; Dodd 2003), como indican las Figuras 4.2.2 y 4.2.3. Los resultados de 2007 sugieren, como los de 2006, un papel de la CK disminuyendo la concentración de Rubisco en hojas jóvenes, pero en 2007 no se observó tendencia general de esta hormona a aumentar al mismo tiempo la proteína - Rubisco y soluble total - en hojas más viejas. Además, el efecto de la CK sobre la proteína fue transitorio, desapareciendo después de la antesis. Se deduce por tanto que los efectos de la CK en los contenidos de Rubisco y proteína soluble fueron menores en 2007 que 2006.

5.2.2.4 Contenidos de Nitrógeno

Las fechas de muestreo fueron diferentes para los análisis de nitrógeno total y de proteína y clorofila. A pesar de ello, los descensos de proteína soluble y Rubisco causados por el CO₂ elevado se correspondieron, como en 2006 y con mayor o menor significación estadística, con los producidos en la concentración de nitrógeno y la cantidad del nutriente en los distintos órganos de la planta, en las tres fechas de muestreo (Tabla 4.2.11). Este efecto del CO₂ elevado no mostró en general diferencias cuando la concentración de nitrógeno se expresó en base al peso seco y al área de los distintos órganos, lo que indica que no fue una dilución del nutriente en mayor masa vegetal, en concordancia con los resultados de 2006 y a diferencia con lo propuesto por otros autores (Drake *et al.*, 1997; Farage *et al.*, 1998; Stitt & Krapp, 1999; Rogers *et al.*, 2006). Como en años anteriores, pero en cuantía menor, el CO₂ elevado tendió a disminuir la fracción del nitrógeno total en la planta asignada a las hojas jóvenes y a aumentarla en la espiga o el tallo. Confirmando el resultado de 2003 y la proposición de Taub y Wang (2008), la disminución de los contenidos de nitrógeno se debió principalmente a una reducción de la absorción del nutriente, que, sin embargo, se atenuó en la antesis con la aplicación de más nitrógeno (Fig. 4.2.15 a) y en la madurez. Este resultado sugiere que el crecimiento en CO₂ elevado disminuye o no la absorción de nitrógeno dependiendo de su disponibilidad en el suelo. La comparación de los tres años conduce a la misma conclusión, ya que sólo en 2006, el año en que dicha disponibilidad fue más alta - como sugiere la mayor abundancia de nitrógeno en

los tejidos vegetales - no hubo una reducción global de la importación del nutriente a la parte aérea de la planta con el CO₂ elevado. También la CK atenuó el efecto negativo del CO₂ elevado, pues el Nt de la parte aérea no disminuyó en la antesis con el CO₂ elevado cuando se aplicó la hormona (Fig. 4.2.15 a). Según Ookawa *et al.* (2003), la CK puede estimular la asignación de nitrógeno a las hojas y estimular la absorción del nutriente.

Los aumentos de proteína Rubisco y soluble total en las hojas con la aplicación de más nitrógeno se correspondieron con incrementos de la concentración foliar del nutriente, tanto por unidad de peso como de superficie foliar, con la excepción de las hojas **a** y **b** de plantas en CO₂ elevado 18 dda (Tabla 4.2.11). Esta excepción se relacionó con el escaso o nulo incremento, con la adición de más nutriente, en la asignación a estas hojas del nitrógeno total en la parte aérea con alto [CO₂] (Nd; Fig. 4.2.16 c). En el experimento de 2003, y el trabajo de Makino *et al.* (1997), se obtuvo el mismo resultado, a diferencia con el experimento con mayor cantidad de nitrógeno por planta de 2006. La aplicación de una dosis alta de nitrógeno tampoco aumentó el %N en la espiga con CO₂ elevado en la antesis, aunque la cantidad de nitrógeno en la espiga (Nt) fue mayor, porque hubo una menor fracción del nitrógeno total (Nd) asignada a este órgano y el nutriente se diluyó en mayor peso, como se discutirá después. La dosis alta de nitrógeno sí aumentó el %N en la espiga 18 dda, pero no el Nt de este órgano, como consecuencia de una reducción en CO₂ ambiente, y sólo un ligero aumento en CO₂ elevado, del Nd y el peso de la espiga. En la madurez la adición de más nitrógeno no elevó el %N del grano, que recibió menor asignación del nitrógeno total como en fechas anteriores, tendió a tener menos Nt y tuvo menos peso - véase más abajo -. En conjunto, los resultados indican que el nitrógeno en dosis alta alteró la distribución de este nutriente entre órganos, disminuyendo su adscripción relativa a la espiga y, como ya se encontró en la madurez en 2006, al grano (Tabla 4.2.10). Una investigación de la respuesta del nitrógeno de la planta a la adición del nutriente ha mostrado que el %N en el grano fue mayor con menor disponibilidad de nitrógeno, pero la asignación del nitrógeno total al grano no varió, concluyéndose que con dosis altas del mismo hay capacidad no usada de almacenaje de nitrógeno en el grano (Oscarson, 2000). En cambio, en un estudio anterior se ha mostrado que, como en 2006 y 2007, la fracción del nitrógeno total recuperada en la espiga disminuyó con la aplicación de nitrógeno, pero la concentración de nitrógeno en el grano aumentó, en contraste con el experimento de 2007, concluyéndose que la espiga tiene una capacidad limitada para acumular nitrógeno (Pérez *et al.*, 1983). Puede deducirse que en 2007 los granos tenían poca capacidad de almacenaje de

Discusión

nitrógeno, o poca capacidad de competir frente a sumideros alternativos. Es posible que el gran número de tallos laterales - ahijamiento - producidos por la variedad de trigo y condiciones ambientales de 2007 - véase Material y Métodos -, y su aumento con el nitrógeno, atrajera parte del nutriente que podría haberse adscrito al grano. La estimulación inicial de la absorción de nitrógeno del suelo con dosis alta del nutriente desapareció en la madurez, probablemente por la competencia del mayor número de tallos secundarios que se originaron con dicha dosis.

La tendencia a disminuir la proteína soluble y la Rubisco en las hojas superiores en plantas que recibieron CK, tuvo escaso reflejo en el %N o el N_A de las mismas en la antesis. Mediado el periodo de crecimiento del grano - 18 dda -, el aumento de N_A de las dos hojas superiores con la aplicación de CK se debió, principalmente, a disminuciones del área discutidas más adelante. El aumento con la CK en el %N en el tallo en la antesis se debió a la reducción en CO_2 ambiente, pero no en CO_2 elevado del Nt (Fig. 4.2.15 a) y las disminuciones en el peso seco de las partes vegetativas que se discutirán posteriormente. Esta hormona redujo sólo ligeramente el nitrógeno total en la parte aérea de la planta a los 18 días después de la antesis, un efecto que desapareció en la madurez. El reparto de nitrógeno entre órganos mostró una tendencia de pequeña magnitud en la antesis a aumentar en las hojas viejas y el tallo con aplicación de CK, como mostraron los estudios de Jordi *et al.* (2000), pero a los 18 dda durante el crecimiento activo del grano, cambió temporalmente a mayor asignación del nitrógeno total a la espiga con menor asignación al tallo, volviendo en la madurez a un aumento en las partes vegetativas y las estructuras de la espiga a expensas del grano. Por consiguiente, los efectos de la CK aumentando la retención del nitrógeno en las partes viejas de la planta encontrados en 2006, se reprodujeron sólo atenuadamente en 2007. Presumiblemente, este efecto de la aplicación de CK depende de la abundancia del nutriente, que fue mayor en 2006.

5.2.2.5 Contenido de clorofila

El aumento del contenido de clorofilas en la hoja **a** inducido por el CO_2 elevado con dosis altas de nitrógeno en la emergencia de la espiga (Fig. 4.2.10) contrasta con su disminución en esta hoja con dosis bajas de nitrógeno y en la hoja **b** con ambas, tanto en la emergencia de la espiga como en la antesis. El aumento inicial de clorofila en la hoja **a** sugiere que con abundancia de nitrógeno el CO_2 elevado estimuló transitoriamente, en fases

tempranas del desarrollo, la síntesis de clorofila, de acuerdo con observaciones precedentes (Pérez *et al.*, 2007). En cambio, no se encontró este efecto del CO₂ elevado en los contenidos de proteínas (Tabla 4.2.9), que se sabe que disminuyen antes que la clorofila durante la ontogenia foliar (Martín del Molino *et al.*, 1995). Es posible que se detectara esta respuesta en la proteína en una fecha anterior a la de muestreo, pues se han encontrado efectos positivos del CO₂ que desaparecen con el tiempo (Geiger *et al.*, 1998). Los efectos descritos del CO₂ sobre la clorofila son comparables con la disminución de la misma en las hojas **b** y **c**, pero no la **a**, en el experimento de 2006. Más aún, la comparación de las Tablas 4.2.7 y 4.2.9 confirma, tanto en la emergencia de la espiga como - en la hoja **a** - durante la antesis, el aumento con el CO₂ elevado en la relación entre clorofila y proteína Rubisco observado en 2006 y en estudios anteriores en cámaras de campo (Pérez *et al.*, 2007), que sugiere un cambio en la asignación de recursos con mayor inversión en la captura de la luz frente a la carboxilación (Makino *et al.*, 1997b ; Mitchell *et al.*, 2000; Osborne *et al.*, 1998; Gutiérrez *et al.*, 2009a). La disminución con CO₂ elevado de la razón Chl a:b en la hoja más vieja y no en las jóvenes durante la emergencia de la espiga, y en todas las hojas en la antesis concuerda con otros estudios (Pérez *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2009a) y puede ser indicativa de un aumento del complejo de captación de la luz respecto a los centros de reacción del PSII (Habash *et al.*, 1995; Kitajima & Hogan, 2003). Osborne *et al.* (1998) también observaron que la aclimatación al aumento de CO₂ en la atmósfera redujo los contenidos de Rubisco y nitrógeno total, pero aumentó el contenido de los complejos clorofila-proteína de la antena, en particular en las hojas inferiores del dosel. El efecto positivo inicial del CO₂ elevado en la concentración de clorofila de la hoja **a** también fue propiciado por la aspersion con CK, como por la dosis alta de nitrógeno, pero sólo transitoriamente en la ontogenia (Fig. 4.2.9 c). La reducción de la clorofila causada por un factor tal como la baja intensidad luminosa se ha demostrado que también se contrarresta con la aplicación de CK (Pons *et al.*, 2001). Esta interacción positiva de CO₂ y CK se invirtió, sin embargo, en la hoja **b** inicialmente y desaparecieron más tarde en ambas hojas. La causa de esta diferencia con el desarrollo foliar no está clara.

El efecto positivo de la adición de más nitrógeno en los contenidos de clorofila en la emergencia de la espiga, confirma la relación general de ambos parámetros reportada por otros autores (Evans *et al.*, 1993; Osborne *et al.*, 1998; Del Pozo *et al.*, 2007), que ya ha sido discutida. Cabe señalar, sin embargo, que después de la antesis el nitrógeno en dosis alta tuvo escaso efecto positivo en la clorofila de la hoja **a** y con aplicación de CK no tuvo

Discusión

efecto sobre el contenido de clorofila de la hoja **b**. Esto contrasta con los aumentos de proteína y Rubisco con la adición de nitrógeno encontrados en la misma fecha. Salvo en la hoja **a** en la emergencia de la espiga, el nitrógeno en dosis alta disminuyó la relación entre clorofila y proteína Rubisco, como se deduce de la comparación de las Tablas 4.2.7 y 4.2.9. Este efecto sólo se observó en la hoja más senescente en 2006, sugiriéndose que se debía al aumento específico de la Rubisco en las hojas de más edad inducido por el nitrógeno. En 2007 se observó más ampliamente, esto es, en las hojas situadas bajo la **a** en la emergencia de la espiga y las **a** y **b** después de la antesis, posiblemente porque el nitrógeno total fue menor que en 2006. De los resultados de los dos años de estudios se deduce que el nitrógeno altera la partición de recursos entre la captura de la luz y la carboxilación, en favor de esta última. Kitajima y Hogan (2003) postularon que cuando el suministro de nitrógeno es limitante su asignación proporcional al PSII debería aumentar a expensas de la asignación a la Rubisco. Los resultados de nuestro estudio son coherentes con dicho postulado. En cambio, no se ha encontrado el aumento de la razón Chl a:b con la escasez de nitrógeno predicho por Kitajima y Hogan (2003), probablemente porque la mayor asignación relativa de nitrógeno al PSII no se dirige sólo al centro de reacción, sino también a la antena.

Frente a la tendencia de la aplicación de CK a disminuir las concentraciones de Chl en las hojas superiores y a aumentarlas en la hoja **c** en 2006, se encontró una respuesta positiva de las clorofilas de todas las hojas a la aplicación de la hormona en 2007, que fue escasa en la emergencia de la espiga y más apreciable después de la antesis. Puede especularse que la CK aumenta la concentración de estos pigmentos (Pons *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003) cuando el nitrógeno es más bajo, como en la hoja más vieja en 2006 y en todas las hojas al avanzar el crecimiento en el año 2007, en el que la disponibilidad del nutriente fue menor. De acuerdo con ese efecto, se ha encontrado que la CK exógena puede evitar la degradación de la clorofila asociada con la senescencia (Jordi *et al.*, 2000; Boonman *et al.*, 2007; Causin *et al.*, 2009). En 2007, en contraste con 2006, la CK aumentó en mayor o menor grado la proporción entre clorofila y Rubisco (Tabla 4.2.7, Tabla 4.2.9), lo que sugiere mayor inversión de nitrógeno en las reacciones fotoquímicas respecto a la carboxilación. La disminución de la razón Chl a:b con la aplicación de CK después de la antesis (Tabla 4.2.7) sugiere que dicha inversión incrementada aumentó la antena respecto al centro de reacción del PSII.

5.2.2.6 Parámetros de crecimiento

La gran producción de tallos, pequeños e improductivos, que se prolongó durante el crecimiento del grano de los tallos de mayor tamaño y precocidad, produjo en 2007 un cultivo anormalmente denso con elevada competencia por la luz y por los nutrientes del suelo. Esto puede explicar el efecto negativo del CO₂ elevado en la superficie verde en tallos individuales cuando el suministro de nitrógeno fue bajo (Tabla 4.2.13), mostrándose nuevamente la interacción positiva del CO₂ elevado y este nutriente. La mayor asimilación de carbono con alto CO₂ condujo, en la antesis y con nitrógeno amplio, a un aumento de peso de las partes más jóvenes, tales como la hoja **a**, el tallo - su último entrenudo - y la espiga (Fig. 4.2.19 b), pero este efecto se minoró con el tiempo desapareciendo 18 dda (Fig. 4.2.19 d) y en la madurez. Por tanto, en este experimento el CO₂ elevado no aumentó el peso de la parte aérea por tallo (Tabla 4.2.13), aunque no se descartan aumentos por unidad de superficie del suelo. Con efectos negativos o nulos en la superficie foliar, y sin afectar o aumentando el peso seco, dependiendo de la dosis de nitrógeno, el CO₂ elevado aumentó en la emergencia de la espiga el LMA, de acuerdo con los resultados de otros autores (Curtis, 1996; Luo *et al.*, 1998; Sims *et al.*, 1998; Peterson *et al.*, 1999; Roderick *et al.*, 1999; Yin, 2002; Ishizaki *et al.*, 2003), pero en contraste con algunos estudios (experimento de 2006, Gutiérrez *et al.*, 2009b). Se requiere una estimación de la masa de los azúcares solubles y el almidón, así como de los compuestos nitrogenados, para conocer si el LMA aumentó como consecuencia de cambios en los compuestos estructurales o no estructurales de las hojas. Este efecto del CO₂ en el LMA desapareció después de la antesis.

Los efectos positivos de la adición de más nitrógeno en la superficie verde y el peso se limitaron generalmente a las plantas de CO₂ elevado. Sus efectos negativos con CO₂ ambiente (Fig. 4.2.19 a, c) y, en la madurez, con ambas concentraciones atmosféricas de CO₂ (Tabla 4.2.13) pudieran estar relacionados con la alta densidad del cultivo que reduciría por competencia el peso de los tallos individuales. El nitrógeno en dosis alta aumentó el contenido de agua de las hojas (Tabla 4.2.13), en contraste con el resultado de 2006, mostrando que, en ausencia de déficit hídrico, el nutriente puede mejorar, más que empeorar, la hidratación de los tejidos vegetales. Como se observó en plantas de CO₂ elevado (Fig. 4.2.2), un aumento de la provisión de nitrógeno puede estimular la capacidad de carboxilación y la conductancia de los estomas (Peterson & Neofotis, 2004), mejorando el estado hídrico de los tejidos si la disponibilidad de agua es adecuada. Inicialmente, el nitrógeno aumentó más el peso que el área de las hojas, como indica el incremento de LMA,

Discusión

especialmente en CO₂ elevado (Fig. 4.2.17 f), que coincide con los resultados de 2006 y de otras investigaciones (Rademacher & Nelson, 2001; Gutiérrez *et al.* 2009b), pero el efecto desapareció después de la antesis igual que el incremento del peso seco de la planta.

Frente a algunos estudios anteriores que han mostrado que la CK aumenta la superficie foliar (Ulvskov *et al.*, 1992), la aspersion de esta hormona disminuyó el área de toda la parte aérea en 2007 (Tabla 4.2.13, Fig. 4.2.17 d), un efecto ya observado sobre las hojas en 2006. De esto se deduce que, en las condiciones de estos experimentos, la CK exógena limita, más que aumentar, la expansión foliar. La humedad de las diversas partes de la planta tendió, con mayor o menor significación, a ser menor en plantas que recibieron CK, confirmando el resultado del experimento de 2006, posiblemente en asociación con aumentos de transpiración (Visotskaya *et al.*, 2003; Dodd, 2003). El incremento del peso de la espiga en la antesis inducido por la CK en 2007 confirma el efecto encontrado el año anterior, sugiriendo también que aumentó la precocidad en la emergencia y expansión de este órgano. A diferencia con el experimento de 2006, sin embargo, esta acción de la CK sólo ocurrió con la mayor provisión de fotoasimilados proporcionada por el CO₂ elevado (Fig. 4.2.19 a, b). En otras partes de la planta la CK tuvo efectos negativos sobre el peso seco en la antesis, probablemente en asociación con un aumento de la partición de asimilados para la espiga, pero 18 dda la CK, nuevamente combinada con CO₂ elevado, no disminuyó el peso de la hoja **b** y el tallo como lo hizo en CO₂ ambiente (Fig. 4.2.19 c, d). Los efectos producidos en el área y el peso seco condujeron a un aumento del LMA en plantas que recibieron CK, que fue más patente avanzada la postantesis (Tabla 4.2.13). Al final del crecimiento, en la cosecha final, la aspersion con CK aumentó el peso del tallo con las hojas y las partes vegetativas de la espiga, con un efecto similar al del año anterior (Tabla 4.2.13). En definitiva, el efecto negativo de la CK sobre el peso seco de algunos órganos pareció ser más bien una redistribución de asimilados en la planta. Los dos años de experimentación sugieren también que la capacidad del grano para atraer asimilados procedentes de las partes vegetativas disminuye con la aplicación de CK.



6. Conclusiones

- 1) El cierre de estomas producido al elevar el CO₂ atmosférico, frecuente en numerosos estudios, no es una respuesta universal; dicho fenómeno está influido en gran medida por las condiciones ambientales.
- 2) El crecimiento en CO₂ elevado provoca generalmente una regulación negativa o disminución de la capacidad fotosintética. Esta aclimatación al CO₂ elevado se asocia con un descenso del contenido de proteína Rubisco, que se debe a una reducción general de la proteína soluble y el nitrógeno total en las hojas.
- 3) Un cambio con el CO₂ elevado en la distribución del nitrógeno en la planta es el causante de la disminución de la concentración de nitrógeno en las hojas jóvenes más activas en la fotosíntesis. Además, el crecimiento en CO₂ elevado disminuye la absorción de nitrógeno del medio de la raíz cuando su disponibilidad es baja.
- 4) El enriquecimiento del aire en CO₂ aumenta la relación entre clorofila y proteína Rubisco, lo que indica mayor inversión en la captura de la luz frente a la carboxilación.
- 5) El CO₂ elevado aumenta la biomasa final y la producción de grano, aunque en cultivos densos puede no modificar el peso de los tallos individuales.
- 6) Un mayor aporte de nitrógeno favorece el aumento de la fotosíntesis inducido por el CO₂ elevado a corto plazo, a través de un estímulo de las reacciones del mesófilo y no de la difusión del CO₂ hasta el cloroplasto. Asimismo, con más suministro de nitrógeno se reduce la aclimatación de la fotosíntesis y la conductancia al CO₂ alto en todas las hojas del dosel vegetal, llegando a invertirse en hojas jóvenes cuando la provisión del nutriente es muy alta.

Conclusiones

- 7) La aplicación de más nitrógeno aumenta la concentración de proteína Rubisco en las hojas, principalmente como consecuencia de un incremento de la proteína soluble y el nitrógeno total; y también porque previene la disminución específica de la Rubisco al avanzar el desarrollo foliar.
- 8) El aumento de la concentración de nitrógeno en los tejidos vegetales con la aplicación de más nutriente es consecuencia de mayor absorción desde el suelo, aunque con alta competencia entre tallos el efecto puede ser transitorio. Además, por encima de cierto umbral de nitrógeno en la parte aérea, la adición de más nitrógeno aumenta la asignación del mismo a las hojas superiores en detrimento de la espiga y, en la madurez, del grano.
- 9) El aumento del suministro de nitrógeno incrementa la concentración de clorofila y no altera el balance entre clorofila y Rubisco o nitrógeno total en las hojas relativamente jóvenes, mientras que lo disminuye en hojas senescentes como consecuencia del aumento específico de la Rubisco en las mismas. De esta forma, el nitrógeno altera la partición de recursos entre la captura de la luz y la carboxilación, en favor de esta última.
- 10) En ausencia de déficit hídrico, el nitrógeno aumenta la hidratación de los tejidos y, también con déficit hídrico, el peso seco por unidad de superficie foliar y el peso de la planta. Algunos de estos efectos desaparecen con el progreso del crecimiento y con alta densidad de tallos.
- 11) La citoquinina - 6-bencilaminopurina - mejora las respuestas a corto y largo plazo al aumento de CO₂ con un aporte alto de nitrógeno, a través de un incremento de la conductancia de los estomas.

- 12) La citoquinina estimula directamente la conductancia de los estomas para valores dados de fotosíntesis en fases tempranas del crecimiento - emergencia de la espiga - y juega un papel indirecto, igualando la relación entre conductancia y fotosíntesis de plantas en CO₂ ambiente y elevado, al avanzar el crecimiento - antesis y postantesis -.
- 13) La aspersión con citoquinina disminuye la concentración de Rubisco en hojas jóvenes. Cuando el nitrógeno es abundante, disminuye además la fracción de la Rubisco en la proteína soluble. Estos efectos no guardan una relación obvia con las modificaciones del efecto del CO₂ en el intercambio gaseoso inducidas por la citoquinina.
- 14) La aspersión con citoquinina tiende a aumentar la incorporación de nitrógeno a la parte aérea de la planta con aplicación alta del nutriente, y a atenuar la disminución de esta incorporación inducida por el CO₂ elevado cuando el nitrógeno es menos abundante. La hormona aumenta en medida variable la retención de compuestos nitrogenados en las partes de la planta de más edad, reduciendo por tanto su movilización hasta los sumideros.
- 15) La citoquinina aumenta la concentración de clorofila en hojas de edad más avanzada, que poseen un contenido de nitrógeno más bajo.
- 16) La citoquinina disminuye la humedad de las hojas, probablemente por elevar su transpiración en condiciones de agua limitante, y aumenta los pesos fresco y seco por unidad de superficie foliar. También acelera, a veces sólo en CO₂ elevado, el crecimiento de la espiga y el peso final de las partes vegetativas. Sin embargo, esta hormona no aumenta el rendimiento final del cultivo.
- 17) Con las variaciones anuales, diferentes concentraciones de CO₂ y dosis de nitrógeno y de citoquinina, la transpiración aumenta la concentración foliar de nitrógeno, disminuyendo así la aclimatación fotosintética al CO₂, sólo con escasez del nutriente en el suelo.

Conclusiones



7. Bibliografía

- Adam NR, Wall GW, Kimball BA, Pinter PJ, LaMorte RL, Hunsaker DJ, Adamsem FJ, Thompson T, Matthias AD, Leavitt SW, Webber A. 2000. Acclimation response of spring wheat in a free-air CO₂ enrichment - FACE - atmosphere with the variable soil nitrogen regimes. 1. Leaf position and phenology determine acclimation response. *Photosynth Res.* 66, 65-77
- Ainsworth EA, Davey PA, Bernacchi CJ, Dermody OC, Heaton EA, Moore DJ, Morgan PB, Naidu SL, Ra HSY, Zhu XG, Curtis PS, Long SP. 2002. A metaanalysis of elevated [CO₂] effects on soybean - *Glycine max* - physiology, growth and yield. *Glob change Biol.* 8, 695-709
- Ainsworth EA, Long SP. 2005. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment - FACE -? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New Phytol.* 165, 351- 372
- Ainsworth EA, Rogers A, Nelson R, Long SP. 2004. Testing the “source-sink” hypothesis of downregulation of photosynthesis in elevated [CO₂] in the field with single gene substitution in *Glycine max*. *Agr Forest Meteorol.* 122, 85-94.
- Ainsworth EA, Rogers A. 2007. The Response of Photosynthesis and Stomatal Conductance to Rising [CO₂]: Molecular Mechanisms and Environmental Interactions. *Plant Cell Environ.* 303, 258-270
- Allen G, Pereira LS, Raes D, Smith M. 2006. Evapotranspiración del cultivo. Guías para la determinación de los requerimientos de agua de los cultivos. ESTUDIO FAO RIEGO Y DRENAJE N° 56, Roma. ISSN 0254-5293
- Allen LH, Beldi SE, Shinn JH. 1985. Modelling the feasibility of free-air carbon dioxide release for vegetation response research. *En: 17th Conference on Agr Forest Meteorol. and 7th Conference on Biometeorology and Aerobiology, Scottsdale, Arizona. Boston, Massachusetts: American Meteorology Society.* 161-164.
- Aloni R, Langhans M, Aloni E, Dreieicher E, Ullrich CI 2005. Root synthesized cytokinin in *Arabidopsis* is distributed in the shoot by the transpiration stream. *J Exp Bot.* 56, 1535-1544
- Alonso A, Pérez P, Martínez-Carrasco R. 2009. Growth in elevated CO₂ enhances temperature response of photosynthesis in wheat. *Physiol Plant.* 135, 109- 120
- Amthor JS, Koch GW, Willms JR, Layzell DB. 2001. Leaf O₂ uptake in the dark is independent of coincident CO₂ partial pressure. *J Exp Bot.* 52, 2235-2238
- Amthor JS. 2001. Effects of atmospheric CO₂ concentration on wheat yield: review of results from experiments using various approaches to control CO₂ concentration. *Field Crop Res.* 73, 1-34.
- Andersson I.. 2008. Cataysis and regulation in Rubisco. *J Exp Bot.* 59, 1555-1568
- Aranda X, Agusti C, Joffre R, Fleck I. 2006. Photosynthesis, growth and structural characteristics of holm oak resprouts originated from plants grown under elevated CO₂. *Physiol Plant.* 128, 302-312
- Aranjuelo I, Irigoyen JJ, Pérez P, Martínez-Carrasco R, Sánchez-Díaz M 2005. The use of temperature gradient tunnels for studying the combined effect of CO₂, temperature and water availability in N₂. fixing alfalfa plants. *Ann Appl Biol* 146, 51-60
- Arnon, DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol-oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 24,1-15

Bibliografía

- Azcón-Bieto J, Fleck I, Aranda X, 2000. Fotosíntesis en un ambiente cambiante. *En: Fundamentos de Fisiología Vegetal*. J. Azcón-Bieto & M. Talón (Eds.) McGraw-Hill Interamericana, 203-216
- Azcon-Bieto J, Gonzalez-Meler MA, Doherty W, Drake BG. 1994. Acclimation of Respiratory O₂ Uptake in Green Tissues of Field-Grown Native Species after Long-Term Exposure to Elevated Atmospheric CO₂. *Plant Physiol.* 106(3), 1163-1168
- Baker NR, Harbinson J, Kramer DM. 2007. Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves. *Plant Cell Environ.* 30, 1107-1125.
- Baker NR. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol* 59, 89-113
- Ball JT, Woodrow IE, Berry JA 1987. A model predicting stomatal conductance and its contribution to the control of photosynthesis under different environmental conditions. *En: Progress in Photosynth Res.* Biggins J. (Ed.) Martinus-Nijhoff Publishers, 221-224.
- Bergmeyer HU, Beutler HO. 1990. Ammonia. *En: Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer HU. (Ed.), 3rd ed., Vol.VIII, 454-461, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge,UK.
- Berner RA, 1999, Atmospheric oxygen over the Phanerozoic time, *PNAS*, 96, 10955-10957
- Berner RA, Kothavala Z. 2001. GEOCARB III: a revised model of atmospheric CO₂ over Phanerozoic time, *American Journal of Science* 301, 182-204.
- Berner RA. 1997, The rise of plants and their effect on weathering and atmospheric CO₂, *Science*, 276, 544
- Boonman A, Prinsen E, Gilmer F, Schurr U, Peeters AJM, Voeselek LACJ, Pons TL 2007. Cytokinin import rate as a signal for photosynthetic acclimation to canopy light gradients. *Plant Physiol.* 143, 1841-1852
- Boonman E, Prinsen F, Gilmer U, Schurr A, Peeters J.M, Voeselek CJ, Pons TL. 2007. Cytokinin Import Rate as a Signal for Photosynthetic Acclimation to Canopy Light Gradients. *Plant Physiol.* 143(4), 1841 - 1852
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Briffa KR, Osborn TJ. 2002. PALEOCLIMATE: Blowing Hot and Cold. *Science* 295. no. 5563, 2227 - 2228 DOI: 10.1126/science.1069486
- Briggie LW. 1980. Origin and botany of wheat. *En: Wheat and Wheat Improvement*, Häfliger E. (Ed.). 2nd ed. *Agronomy* 13, 1-32
- Brodribb TJ, McAdam SAM, Jordan GJ, Feild TS. 2009. Evolution of stomatal responsiveness to CO₂ and optimization of water-use efficiency among land plants. *New Phytol.* 183, 839-847
- Bunce JA. 2001. Direct and acclimatory responses of stomatal conductance to elevated carbon dioxide in four herbaceous crop species in the field. *Glob change Biol.* 7, 323-331
- Bunce JA. 2004. Carbon Dioxide Effects on Stomatal Responses to the Environment and Water Use by Crops under Field Conditions. *Oecologia*, 140, 1 1-10

- Butler WL. 1978. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol* 29, 345-78
- Caemmerer SV, Quick WP. 2000. Rubisco: Physiology in vivo. *En: Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. R.C. Leegood, T.D. Sharkey & S. Von Caemmerer (Eds.). Kluwer Academic Publishers 85-113
- Caemmerer SV. 2000. Biochemical models of leaf photosynthesis. Series: Techniques in plant sciences. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. 9-41
- Caemmerer SV, Lawson T, Oxborough, K, Baker NR, Andrews TJ, Raines CA. 2004. Stomatal conductance does not correlate with photosynthetic capacity in transgenic tobacco with reduced amounts of Rubisco. *J Exp Bot.* 55, 1157-1166.
- Causin HF, Roberts IN, Criado MV, Gallego SM, Pena LB, Ríos MC, Barneix AJ. 2009. Changes in hydrogen peroxide homeostasis and cytokinin levels contribute to the regulation of shade-induced senescence in wheat leaves. *Plant Sci.* 177, 698-704.
- Charles-Edwards DA, Stutzel H, Ferraris R, Beech DF. 1987. An analysis of spatial variation in the nitrogen content of leaves from different horizons within a canopy. *Ann. Bot.* 60, 421-426
- Cheng SH, Moore BD, Seemann JR. 1998. Effect of short and long-term elevated CO₂ on the expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 116, 715-723
- Chory J, Reinecke D, Sim S, Washburn T, Brenner M. 1994. A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 104, 339-347
- Collier M.D, Huitson S, Hanke DE. 2000. Altering N nutrition changes the cytokinin content of leaves of woody plants. *Phyton* 40, 13- 16
- Collier MD, Fotelli MN, Nahm M, Kopriva S, Rennenberg H, Hanke DE, Gessler A 2003. Regulation of nitrogen uptake by *Fagus sylvatica* on a whole plant level - interactions between cytokinins and soluble N compounds. *Plant Cell Environ* 26, 1549- 1560
- Conroy J, Hocking P. 1993. Nitrogen nutrition of C3 plants at elevated atmospheric CO₂ concentrations. *Physiol Plant.* 89, 570-576
- Criado MV, Caputo C, Roberts IN, Castro MA, Barneixa AJ 2009. Cytokinin-induced changes of nitrogen remobilization and chloroplast ultrastructure in wheat - *Triticum aestivum* -. *J. Plant Physiol.* 166, 1775-1785.
- Crowley TJ. *et al.* 2000. Causes of Climate Change Over the Past 1000 Years. *Science.* 289, 270 DOI: 101126/science.2895477270
- Cubasch U, G. A. Meehl, G. J. Boer, R. J. Stouffer, M. Dix, A. Noda, C. A. Senior, S. Raper and K. S. Yap, 2001. Projections of future climate change. *En: Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Houghton JT, Ding DJ. Griggs M, Noguer P, van der Linden X. (Eds.). Cambridge University Press, ISBN 0521 01495 6
- Curtis PS, Wang XZ. 1998. A metaanalysis of elevated CO₂ effects on woody plant mass, form, and physiology. *Oecologia* 113, 299-313

Bibliografía

- Curtis PS. 1996. A meta-analysis of leaf gas exchange and nitrogen in trees grown under elevated carbon dioxide. *Plant Cell Environ.* 19,127-137
- De las Rivas J. 2000. La luz y el aparato fotosintético. *En: Fundamentos de Fisiología Vegetal.* J. Azcón-Bieto & M. Talón (Eds.) McGraw-Hill Interamericana, 131-153
- De Luis I, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz M. 2002. Low vapour pressure deficit reduces the beneficial effect of elevated CO₂ on growth of N₂-fixing alfalfa plants. *Physiol Plant.* 116, 497-502
- Del Pozo A, 1992. Carbon/Nitrogen Relation in Cereals and Legumes. PhD Thesis, University of Reading.
- Del Pozo A, 1994. Leaf area index and relative irradiance within the canopy of wheat and faba bean. *Proceedings of the 3rd European Society for Agronomy, Abano-Padova, Italy,* 108-109
- Del Pozo A, Dennett MD. 1999. Analysis of the distribution of irradiance, leaf nitrogen and photosynthesis within the canopy of *Vicia faba* L. at two contrasting densities. *Austr. J. Agric. Res.* 50, 183-189
- Del Pozo A, Pérez P, Gutiérrez D, Alonso A, Morcuende R, Martínez-Carrasco R. 2007. Gas exchange acclimation to elevated CO₂ in upper-sunlit and lower-shaded canopy leaves in relation to nitrogen acquisition and partitioning in wheat grown in field chambers. *Environ Exp Bot* 59, 371-380
- Del Pozo A, Pérez P, Morcuende R, Alonso A, Martínez-Carrasco R 2005. Acclimatory responses of stomatal conductance and photosynthesis to elevated CO₂ and temperature in wheat crops grown at varying levels of N supply, in a Mediterranean environment. *Plant Sci.* 169, 908-916
- Delgado E, Mitchell RAC, Parry MAJ, Driscoll SP; Mitchell VJ, Lawlow DW 1994. Interacting effects of CO₂ concentration, temperature and nitrogen supply on the photosynthesis and composition of winter wheat leaves. *Plant Cell Environ* 17, 1205-1213
- den Hertog J, Stulen I, Fonseca F, Delea P. 1996. Modulation of carbon and nitrogen allocation in *Urtica dioica* and *Plantago major* by elevated CO₂: impact of accumulation of nonstructural carbohydrates and ontogenetic drift. *Physiol Plant.* 98, 77-88
- Dodd IC. 2003. Hormonal interactions and stomatal responses. *J. Plant Growth Regul.* 22, 32-46
- Dodd I, Ngo CN, Turnbull, CG, Beveridge CA. 2004. Effects of nitrogen supply on xylem cytokinin delivery, transpiration and leaf expansion of pea genotypes differing in xylem-cytokinin concentration. *Funct Plant Biol.* 31 9, 903-911
- Drake BG, González-Meler MA, Long SP 1997. More efficient plants, A consequence of rising atmospheric CO₂? *Annu Rev Plant Physiol.* 48, 609-39
- Dreccer MF, van Oijen M, Pot CS, Rabbinge R. 2000. Dynamics of vertical leaf nitrogen distribution in a vegetative wheat canopy Impact on canopy photosynthesis. *Ann. Bot.* 86, 821-831
- Ellis RJ. 1979. The most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Sciences* 4, 241-244.

- Eskling, M, Arvidsson, P.O, Akerlund, H.E. 1997. The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiol Plant.* 100, 806-816
- Evans JR 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia* 78, 9-19
- Evans JR. 1993. Photosynthetic acclimation and nitrogen partitioning within a lucerne canopy I. Canopy characteristics. *Austr. J. Plant Physiol.* 20, 55-67
- Fallai H, Scofield GN, Badger MR, Chow WS, Furbank RT, Ruang YL. 2008. Localization of sucrose synthase in developing seed and siliques of *Arabidopsis thaliana* reveals diverse roles for SUS during development. *J Exp Bot.* 59, 3283-3295
- Farage PK, McKee IF, Long SP 1998. Does a low nitrogen supply necessarily lead to acclimation of photosynthesis to elevated CO₂? *Plant Physiol.* 118, 573-80
- Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA. 1980. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C3 species. *Planta* 149, 78-90
- Feller U, Anders I, Mae T. 2008. "Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated". *J Exp Bot.* 59, 1615-24. doi:101093/jxb/erm242
- Feller U. 1986. Proteolytic enzymes in relation to leaf senescence. *En: Plant Proteolytic Enzymes II.* Dalling M J. (Ed.) Florida: CRC Press. 49-68
- Ferreira RB, Esquivel MG, Teixeira AR. 2000. Catabolism of ribulose biphosphate carboxylase from higher plants. *Current Topics in Phytochemistry* 3,129-165.
- Ferreira RB, Teixeira AR. 1992. Sulfur starvation in *Lemna* leads to degradation of ribulose-biphosphate carboxylase without plant death. *J. Biol. Chem.* 267,7253-7257
- Foyer CH, Lescure JC, Lefebvre C, Morot-Caudry JF, Vincentz M, Vaucheret H. 1994. Adaptations of photosynthetic electron transport, carbon assimilation, and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana Plumbaginifolia* plants to changes in Nitrate Reductase activity. *Plant Physiol.* 104, 171-178
- Frank HA, Cua A, Chynwat V, Young A, Gosztola D, Wasielewski MR. 1996. The lifetimes and energies of the first excited singlet states of diadinoxanthin and diatoxanthin: the role of these molecules in excess energy dissipation in algae. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1277, 243-252
- Galloway JN. 1998. The global nitrogen cycle: changes and consequences. *Environmental Pollution* 102, S1 15-24
- Garcia RL, Long SP, Wall GW, Osborne CP, Kimball BA, Nie GY, Pinter Jr. PJ, LaMorte RL, Wechsung F 1998. Photosynthesis and conductance of springwheat leaves: field response to continuous free-air atmospheric CO₂ enrichment. *Plant Cell Environ* 21, 659-669
- Gaudino RJ, Pikaard CS 1997. Cytokinin induction of RNA polymerase I transcription in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 272, 6799- 6804.
- Geigenberger P, Kolbe A, Tiessen A. 2005. Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *J Exp Bot.* 56, 1469-1479
- Geiger DR, Servaites JC. 1994. Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C3 plants. *Annu Rev Plant Physiol* 45, 235-256
- 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

Bibliografía

- metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant Cell Environ* 22, 1177- 1199
- Geiger M, Walch-Liu P, Engels C, Harnecker J, Schulze ED, Ludewig F, Sonnewald U, Scheible WR, Stitt M. 1998. Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants, and a large stimulation of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. *Plant Cell Environ.* 21, 253-268
 - GENVCE (Grupo para la Evaluación de Nuevas Variedades de Cultivos en España). www.genvce.org
 - Giardi MT, Cona A, Geiken B, Kucera T, Masojídek J, Mattoo AK. 1996. Long-term drought stress induces structural and functional reorganization of Photosystem II. *Planta* 199, 118-125.
 - Gloser V, Frehner M, Lüscher A, Nösberger J, Hartwig UA. 2002. Does the response of perennial ryegrass to elevated CO₂ concentration depend on the form of the supplied nitrogen? *Biol. Plant.* 45, 51-58
 - González-Meler MA, Taneva L. 2005. Integrated effects of atmospheric CO₂ concentration on plant and ecosystem respiration. *En: Plant Respiration: From Cell to Ecosystem. Advances in Photosynthesis and Respiration Series: Lambers H, Ribas-Carbo M (Eds.) Plant Respiration: From Cell to Ecosystem.* 18. Springer, Dordrecht, Chapter 13, 225-240
 - Grace J, van Gardingen P.R, Raschi A. 1997. Sites of naturally-elevated CO₂. *En: A.Raschi, F.Miglietta, R.Tognetti, P.R.van Gardingen (Eds.), Plant responses to elevated CO₂. Evidence from natural springs.* Cambridge University Press, Cambridge. 1-6
 - Griffin K.L, Anderson O.R, Gastrich M. D, Lewis J.D, *et al.* 2001. Plant growth in elevated CO₂ alters mitochondrial number and chloroplast fine structure *PNAS* 98, 2473-2478
 - Gutiérrez D, Gutiérrez E, Pérez P, Morcuende R, Verdejo AL, Martínez-Carrasco R. 2009a. Acclimation to future atmospheric CO₂ increases photochemical efficiency and mitigates photochemistry inhibition by warm temperatures in wheat under field chambers. *Physiol Plant.*137, 86-100
 - Gutiérrez E, Gutiérrez D, Morcuende R, Verdejo AL, Kostadinova S, Martínez-Carrasco R, Pérez P. 2009b. Changes in leaf morphology and composition with future increases in CO₂ and temperature revisited. Wheat in field chambers. *J. Plant Growth Regul.* 28, 349-357
 - Habash DZ, Matthew JP, Parry MAJ, Keys AJ, Lawlor DW. 1995. Increased capacity for photosynthesis in wheat grown at elevated CO₂: the relationship between electron transport and carbon metabolism. *Planta* 197, 482-489
 - Hadley P, Batts GR, Ellis RH, Morison JIL, Pearson S, Wheeler TR. 1995. Temperature gradient chambers for research on global environment change. II. A twin-wall tunnel system for low stature, field-grown crops using a split heat pump: technical report. *Plant Cell Environ.* 18, 1055-1063
 - Hansen J *et al.* 2008. Target atmospheric CO₂: Where should humanity aim? *Open Atmos. Sci. J.* 2, 217-231 DOI: 102174/1874282300802010217

- Heath OVS. 1948. Control of stomatal movement by a reduction in the normal carbon dioxide content of the air. *Nature* 161, 179-181
- Heldt H. (ed.) 2005. *Plant Biochemistry*. Elsevier Academic Press, London.
- Hendrey GR, Lewin KF, Nagy J. 1994. Control of carbon dioxide in unconfined field plots. *En: Design and Execution of Experiments in CO₂ Enrichment*. Schulze E.D, Mooney H.A, (Eds.). Reidel, Dordrecht, Germany, EEC Publications.
- Hikosaka K. 2004. Interspecific difference in the photosynthesis-nitrogen relationship, patterns, physiological causes, and ecological importance. *J. Plant Res.* 117, 481-494.
- Hill R, Bendall F 1960. Function of the two cytochrome components in chloroplasts; a working hypothesis. *Nature* 186, 136-137
- Hirel B, Gallais A. 2006. Rubisco synthesis, turnover and degradation: some new thoughts on an old problem. *New Phytol.* 169, 443-445
- Hirose T, Werger MJA, van Rheenan JWA. 1989. Canopy development and leaf nitrogen distribution in a stand of *Carex acutiformis*. *Ecology* 70, 1610-1618
- Horneck, D. A. and R. O. Miller. 1998. Determination of Total Nitrogen in Plant Tissue. Y. P. Karla (ed.) *En: Handbook of Reference Methods for Plant Analysis*. CRC Press, Boca Raton, FL 33431. 75-83
- Hurry V, Strand A, Furbank R, Stitt M. 2000. The role of inorganic phosphate in the development of freezing tolerance and the acclimatization of photosynthesis to low temperature is revealed by the pho mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 24, 383-396
- Hymus GJ, Ellsworth DS, Baker NR, Long SP. 1999. Does free-air carbon dioxide enrichment affect photochemical energy use by evergreen trees in different seasons? A chlorophyll fluorescence study of mature loblolly pine. *Plant Physiol.* 120, 1183-1191
- IPCC 2001. Panel Intergubernamental de Cambio Climático de la ONU. La base científica. Tercer Informe de Evaluación. Cambio climático. Houghton JT, Yihui D. *et al.*, (Eds.) Cambridge University Press, Cambridge.
- IPCC 2007. Cambio Climático 2007: la Base Física de las Ciencias. Resumen para los Formuladores de Políticas. Houghton J.T., Yihui D. *et al.*, (Eds.) Panel Intergubernamental de Cambio Climático de la ONU. Cambridge University Press, Cambridge. <http://www1.ipcc.ch/graphics/gr-ar4-wg1.htm>
- Irving LJ, Robinson D. 2005. A dynamic model of Rubisco turnover in cereal leaves. *New Phytol.* 169, 493-504.
- Ishizaki S, Hikosaka K, Hirose T. 2003. Increase in leaf mass per area benefits plant growth at elevated CO₂ concentration. *Ann Bot.* 91, 1-10
- Jacob J, Greitner C, Drake BG 1995. Acclimation of photosynthesis in relation to Rubisco and nonstructural carbohydrate contents and in-situ carboxylase activity in *Scirpus olneyi* grown at elevated CO₂ in the field. *Plant Cell Environ.* 18, 875-84.
- Jahnke S, Krewitt M. 2002. Atmospheric CO₂ concentration may directly affect leaf respiration measurement in tobacco, but not respiration itself. *Plant Cell Environ.* 25, 641-651.
- Jang JC, Sheen J. 1994. Sugar Sensing in Higher Plants. *Plant Cell*, 6, 1665-1679

Bibliografia

- Johnson JW, Lee RD, Barnett R. 2000. Wheat Growth and Development, *En: Southern Small Grains. Resource Management Handbook. Bulletin 1190* G. David Buntin & M. Barry Cunfer (Eds.). The University of Georgia College of Agricultural and Environmental Sciences and the U.S. Department of Agriculture. 5-9
- Jones H, Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *J Exp Bot* 1998, 49,387-398
- Jordan DB, Ogren WL. 1984. The CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: Dependence on ribulose bisphosphate concentration, pH and temperature. *Planta*. 161, 308-313
- Jordi W, Schapendonk A, Davelaar E, Stoopen GM, Pot CS, De Visser R, Van Rhijn JA, Gan S, Amasino RM. 2000. Increased cytokinin levels in transgenic P_{SAG12}-*IPT* tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *Plant Cell Environ*. 23, 279-289
- Kanemoto K, Yamashita Y, Ozawa T, Imanishi N, Nguyen NT, Suwa R, Mohapatra PK, Kanai S, Moghaieb RE, Ito J, El-Shemy H, Fujita K. 2009. Photosynthetic acclimation to elevated CO₂ is dependent on N partitioning and transpiration in soybean. *Plant Sci*. 177, 398-403
- Kasting J. 2005, Methane greenhouses and antigreenhouses on the early Earth. *Earth System Processes, Calgary* 2-8
- Kaufman A. 2003, High CO₂ levels in the Proterozoic atmosphere estimated from analyses of individual microfossils. *Nature* 425, 279-2
- Kellomaki S, Vaisanen H. 1997. Modelling the dynamics of the forest ecosystem for climate change studies in the boreal conditions. *Ecological Modelling*. 97, 121-140
- Kim HY, Lieffering M, Kobayashi K, Okada M, Miura S. 2003. Seasonal changes in the effects of elevated CO₂ on rice at three levels of nitrogen supply: a free air CO₂ enrichment - FACE - experiment. *Glob change Biol*. 9, 826-837
- Kimball BA. 1983. Carbon dioxide and agricultural yield: an assemblage and analysis of 430 prior observation. *Agronomy Journal* 75, 779-786
- Kitajima K, Hogan KP. 2003. Increases of chlorophyll *a/b* ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. *Plant Cell Environ*. 26, 857-865.
- Knight S, Andersson I, Brändén CI. 1990. Crystallographic analysis of ribulose-1,5-bisphosphate caboxylase from spinach at 2.4 Å resolution: subunit interactions and the active site. *Journal of Molecular Biology* 215, 113-160
- Koch KE. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu rev plant phys*. 47, 509-40
- Kokubun N, Ishida H, Makino A, Mae T. 2002. The degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase into the 44-kDa fragment in the lysates of chloroplasts incubated in darkness. *Plant Cell Physiol*, 43, 1390-1394.
- Körner C. 2006. Plant CO₂ response: an issue of definition, time and response supply. *New Phytol*.172, 393-411.
- 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

- Krause GH, Weis E. 1988. The photosynthetic apparatus and chlorophyll fluorescence: an introduction. *En: Applications of chlorophyll fluorescence. Photosynth Res. stress physiology, hydrobiology and remote sensing.* Lichtenthaler, H.K. (ed.) 3-12 Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Krause GH, Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. The basis. *Annu Rev Plant Biol* 42, 313-349
- Krause, G.H. 1988. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol Plant.* 74, 566-574
- Krivova N.A, Solanki S.K. 2004. Solar variability and global warming: a statistical comparison since 1850. *Advances in Space Research* 34 361-364
- Lachat Instruments (Rev. 1993), Method Number 10-107-06-2-E, Total Kjeldahl Nitrogen in waters.
- Laemmli UK, Favre M. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T₄. I. DNA packaging events. *J Mol Biol.* 80(4), 575-99
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227, 680-685
- Larcher W. 2003. *Physiological Plant Ecology.* Springer-Verlag, Berlin. 57-166
- Lawlor DW. 1987. *Photosynthesis: metabolism, control and physiology.* Longman Scientific & Technical. Harlow. UK
- Lawlor DW. 1993. *Photosynthesis: molecular, physiological and environmental processes,* 2nd ed. Longman Scientific and Technical (Ed.) Burnt Mill, Harlow: Essex, CM20 JE, England.
- Lawlor DW. 2005. *Plant Responses to Climate Change. En: Plant Responses to Air Pollution and Global Change.* Omasa K, Nouchi I, De Kok A, Luit J. (Eds.) Springer-Verlag, Tokyo, 81-88 ISBN: 978-4-431-31013-6
- Lee TD, Tjoelker MG, Ellsworth DS, Reich P.B. 2001. Leaf gas exchange responses of 13 prairie grassland species to elevated CO₂ and increased nitrogen supply. *New Phytol.* 150, 405-418
- Lemaire G, Onillon B, Gosse G, Chartier M, Allirand JM. 1991. Nitrogen distribution within a lucerne canopy during regrowth: relation with light distribution. *Ann. Bot.* 68, 483-8
- Lenton T, A. Watson, 2004, Biotic enhancement of weathering, atmospheric oxygen and carbon dioxide in the Neoproterozoic, *Geophysical Research Letters.* 31, L05202, doi:10.1029/2003GL018802,2004
- Lerbs S, Lerbs W, Klyachko NL, Romano EG, Kulaeva ON, Wollgiehn R Pathier B 1984 Gene expression in cytokinin and light mediated plastogenesis of *Cucurbita* cotyledons. *Planta* 162, 289-298
- Liozon R, Badeck FW, Genty B, Meyer S, Saugier B. 2000. Leaf photosynthetic characteristics of beech - *Fagus sylvatica* L. - saplings stands during three years of CO₂ exposure. *Tree Physiol.* 20, 239-248
- 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 Environ* 24, 77- 88

Bibliografia

- Long SP 1991. Modification of the response of photosynthetic productivity to rising temperature by atmospheric CO₂ concentrations: Has its importance been underestimated? *Plant cell environ.* 14, 729-739
- Long SP, Ainsworth EA, Rogers A, Ort DR. 2004. Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future. *Annu Rev Plant Biol.* 55, 591-628
- Long SP, Ainsworth EA, Leakey ADB, Nösberger J, Ort DR. 2006. Food for thought, lower-than-expected crop yield stimulation with rising CO₂ concentrations. *Science* 312, 1918-1921
- Lorimer GH, Mizioro HM. 1980. Carbamate formation on the epsilon-amino group of a lysyl residue as the basis for the activation of ribulosebiphosphate carboxylase by CO₂ and Mg²⁺. *Biochemistry* 19,5321-5328
- Lötscher M, Stroh K, Schnyder H. 2003. Vertical leaf nitrogen distribution in relation to nitrogen status in grassland plants. *Ann. Bot.* 92, 679-688
- Lu QB. 2009. Correlation between Cosmic Rays and Ozone Depletion. *Physical review letters* vol.102 DOI: 10.1103/PhysRevLett.102.118501
- Ludewig F, Sonnewald U, Kauder F, Heineke D, Geiger M, Stitt M, Frommer WB. 1998. The role of transient starch in acclimation to elevated atmospheric CO₂. *FEBS letters* 429, 147-151
- Ludewig F, Sonnewald U. 2000. High CO₂-mediated down-regulation of photosynthetic gene transcripts is caused by accelerated leaf senescence rather than sugar accumulation. *FEBS Lett.* 49, 19-24.
- Luo Y, Sims DA, Griffin KL. 1998. Nonlinearity of photosynthetic responses to growth in rising atmospheric CO₂: an experimental and modelling study. *Glob change Biol.* 4, 173-183.
- Luo ZB, Calfapietra C, Liberloo M, Scarascia-Mugnozza G, Polle A. 2006. Carbon partitioning to mobile and structural fractions in poplar wood under elevated CO₂ - EUROFACE - and N fertilization. *Glob Change Biol.* 12, 272-283.
- Mackowiak CL, Wheeler RM. 1996. Growth and stomatal behavior of hydroponically cultured potato *Solanum tuberosum* L. at elevated and super-elevated CO₂. *J. Plant Physiol.* 149,205-210
- Makino A, Harada M, Sato T, Nakano H, Mae T. 1997 a. Growth and N allocation in rice plants under CO₂ enrichment. *Plant Physiol.* 115, 199-203.
- Makino A, Shimada T, Takumi S, Kaneko K, Matsuoka M, Shimamoto K, Nakano H, Miyao-Tokutomi M, Mae T, Yamamoto N 1997 b. Does decrease in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by antisense *RbcS* lead to a higher N-use efficiency of photosynthesis under conditions of saturating CO₂ and light in rice plants? *Plant Physiol* 114, 483-491
- Makino A. 2003. Rubisco and nitrogen relationships in rice. Leaf photosynthesis and plant growth. *Soil Science and Plant Nutrition* 49, 319-327
- Malkin R, Niyogi K. 2000. Photosynthesis. *En: Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* Buchanan B, Gruissem W, Jones R (Eds.) American Society of Plant Physiologists. 568-628

- Marín-Navarro J, Moreno J. 2003. Modification of the proteolytic fragmentation pattern upon oxidation of cysteines from ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Biochemistry* 42, 14930-14938
- Markwell JP, Thornber JP, Boggs RT. 1979. Higher plant chloroplasts: evidence that all the chlorophyll exists as chlorophyll-protein complexes. *PNAS* 76. 1233-1235.
- Martín del Molino I, Martínez-Carrasco R, Pérez P, Hernandez L, Morcuende R, Sánchez de la Puente L 1995. Influence of nitrogen supply and sink strength on changes in leaf nitrogen compounds during senescence in two wheat cultivars. *Physiol Plant.* 95, 51-58
- 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. *Environ Exp Bot.* 54, 49-59
- McDonald EP, Erickson JE, Kruger EL. 2002. Can decreased transpiration limit plant nitrogen acquisition in elevated CO₂? *Funct Plant Biol.* 29, 1115-1120.
- Medlyn BE, Barton C.V.M, Broadmeadow M.S.J, Ceulmans R, De Angelis P, Forestreuter M, Freeman M, Jackson SB, Kellomäki S, Laitat E, Rey A, Roberntz P, Sigurdsson BD, Strassemer J, Wang K, Curtis PS, Jarvis PG. 2001. Stomatal conductance of forest species after long-term exposure to elevated CO₂ concentration: a synthesis. *New Phytol.* 149, 247-264.
- 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. 173-185.
- Messinger SM, Buckley TN, Mott KA. 2006. Evidence for involvement of photosynthetic processes in the stomatal response to CO₂. *Plant Physiol.* 140, 771-778
- Millard P. 1988. The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. *Plant Cell Environ.* 11, 1- 8
- Mitchell RAC, Theobald JC, Parry MAJ, Lawlor DW (2000) Is there scope for improving balance between RuBP-regeneration and carboxylation capacities in wheat at elevated CO₂? *J. Exp Bot* 51: 391-397
- Moore BD, Cheng SH, Sims D, Seemann JR. 1999. The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant Cell Environ.* 22, 567-582
- Morcuende R, Pérez P, Martínez-Carrasco R. 1997. Shortterm feedback inhibition of photosynthesis in wheat leaves supplied with sucrose and glycerol at two temperatures. *Photosynthetica* 33, 179-188
- Morcuende R, Krapp A, Hurry V, Stitt M. 1998. Sucrose feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased rates of oxoglutarate synthesis, and increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves. *Planta* 206, 394-409
- Morrison JIL. 1998. Stomatal response to increased CO₂ concentration. *J Exp Bot* 49, 443-452
- Mott KA, Woodrow IE. 1993. Effects of O₂ and CO₂ on Non steady-State Photosynthesis - Further Evidence for Rubisco Limitation -. *Plant Physiol* 102, 859-866
- Mott KA. 1988. Do stomata respond to CO₂ concentration other than intercellular? *Plant Physiol* 86, 200-203

Bibliografia

- Mott KA. 2009. Opinion: Stomatal responses to light and CO₂ depend on the mesophyll. *Plant Cell Environ.* 32, 1479-1486
- Mulholland BJ, Craigon J, Black CR, Colls JJ, Atherton J, Landon G. 1997. Effects of elevated carbon dioxide and ozone on the growth and yield of spring wheat - *Triticum aestivum* L. - *J Exp Bot.* 48, 113-122
- Mustárdy, L. 1996. Development of thylacoid membrane stacking. *En: Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions.* Ort, D.R. & Yocum, C.F., (Eds.) 59-61
- 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 Physiol.* 115, 191-198
- Nie GY, Hendrix DL, Webber AN, Kimball BA, Long SP. 1995a. Increased accumulation of carbohydrates and decreased photosynthetic gene transcript levels in wheat grown at an elevated CO₂ in the field. *Plant Physiol.* 108, 975-983
- Nie GY, Long SP, Garcia RL, Kimball BA, LaMorte RL, Pinter PJ Jr, Wall GW, Webber AN 1995b. Effects of free air CO₂ enrichment on the development of the photosynthetic apparatus in wheat, as indicated by changes in leaf proteins. *Plant Cell Environ* 18, 855-64.
- Nielsen TH, Ulvskov P. 1992. Cytokinins and leaf development in sweet pepper - *Capsicum annuum* L. - II. Sink metabolism in relation to cytokinin-promoted leaf expansion. *Planta* 188, 78- 84.
- Niittyla T, Messerly G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeemann SC. 2004. A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* 303, 87-89
- Nobel PS. 1991. Photochemistry of Photosynthesis. *En: Physiochemical and Environmental Plant Physiology*, 245-296. Academic Press, Inc. San Diego, California.
- Norby RJ, Wullschleger SD, Gunderson CA, Johnson DW, Ceulemans R 1999. Tree responses to rising CO₂ in field experiments, implications for the future forest. *Plant Cell Environ.* 22, 683- 714
- Ogren WL. 1984. Photorespiration: Pathways, regulation, and modification. *Annu Rev Plant Physiol.* 35,415-442
- Ookawa T, Naruoka Y, Yamazaki T, Suga J, Hirasawa T. 2003. A comparison of the accumulation and partitioning of nitrogen in plants between two rice cultivars, akenohoshi and Nipponbare, at the ripening stage. *Plant Production Science* 6, 172-178
- Ookawa T, Naruoka Y, Sayama A, Hirasawa T. 2004. Cytokinin Effects on Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase and Nitrogen Partitioning in Rice during Ripening. *Crop Sci.* 44, 2107-2115
- Osborne CP, LaRoche J, Garcia RL, Kimball BA, Wall GW, Pinter PJ Jr., LaMorte RL, Hendrey GR, Long SP 1998. Does leaf position within a canopy affect acclimation of photosynthesis to elevated CO₂? *Plant Physiol.* 117, 1037-1045.
- Oscarson P. 2000. the strategy of the wheat plant in acclimating growth and grain production to nitrogen availability. *J Exp Bot.* 51, 1921-1929
- Osmond B, Badger M, Björkman O, Leegood R. 1997. Too many photons: Photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends Plant Sci* 2, 119-121

- Pagani M. *et al.*, 2005, Marked decline in atmospheric carbon dioxide concentrations during the Paleogene. *Science*, 309, 600-603
- Parry MAJ, Madgwick PJ, Carvahlo JFC, Andraloj PJ. 2007. Prospects for increasing photosynthesis by overcoming the limitations of Rubisco. *J. Agricultural Science*. 145, 31-43
- Paul MJ, Foyer CH, 2001 Sink regulation of photosynthesis. *J Exp Bot*. 52, N° 360, 1383-1400
- Pearman I, Thomas SM, Thorne GN. 1977. Effects of nitrogen fertilizer on growth and yield of spring wheat. *Ann Bot*. 41, 93-108
- Pérez P, Martínez-Carrasco R, Sánchez de la Puente L. 1983. Uptake and distribution of nitrogen in wheat plants supplied with different amounts of nitrogen after stem elongation. *Ann Appl Biol*. 102, 399-406
- Pérez P, Morcuende R, Martín del Molino I, Martínez-Carrasco R. 2005. Diurnal changes of Rubisco in response to elevated CO₂, temperature and nitrogen in wheat grown under temperature gradient tunnels. *Environ Exp Bot*. 53, 13-27
- Pérez P, Zita G, Morcuende R, Martínez-Carrasco R. 2007. Elevated CO₂ and temperature differentially affect photosynthesis and resource allocation in flag and penultimate leaves of wheat. *Photosynthetica* 45: 9-17.
- 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 Environ*. 22, 1109-1119
- Peterson AG, Ball JT, Luo Y, Field CB, Reich PB, Curtis PS, Griffin KL, Gunderson CA, Norby RJ, Tissue DT, Forstreuter M, Rey A, Vogel CS. 1999. The photosynthesis leaf nitrogen relationship at ambient and elevated atmospheric carbon dioxide: a meta-analysis. *Glob change Biol*. 5, 331-346
- Peterson AG, Neofotis PG. 2004. A hierarchical analysis of the interactive effects of elevated CO₂ and water availability on the nitrogen and transpiration productivities of velvet mesquite seedlings. *Oecologia* 141, 629-640
- Petit, JR, *et al.* 1999. Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature* 399, 429-436
- Pieters AJ, Paul MJ, lawlor DW, 2001 Low sink demand limits photosynthesis under Pi deficiency. *J Exp Bot*. 52, N°. 358, 1083-1091, 2001
- Pitre FE, Cooke JEK, Mackay JJ. 2007. Short-term effects of nitrogen availability on wood formation and fibre properties in hybrid poplar. *Trees Struct Funct* 21, 249-259
- Polley HW, Johnson HB, Tischler CR, Torbert HA, 1999. Links between transpiration and plant nitrogen: variation with atmospheric CO₂ concentration and nitrogen availability. *Int. J. Plant Sci*. 160, 535-542
- Pons TL, Jordi W, Kuiper D. 2001. Acclimation of plants to light gradients in leaf canopies: evidence for a possible role for cytokinins transported in the transpiration stream. *J. Exp Bot*. 52, 1563-1574.
- Portis Jr. AR. 2003. Rubisco activase-Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynth Res*. 75, 11-27

Bibliografía

- Prats J, Clement-Grandcourt M. 1969. Los cereales. Ediciones mundiprensa
- Pritchard SG, Peterson CM, Prior SA, Rogers HH. 1997. Elevated carbon dioxide differentially affects needle ultrastructure and floem anatomy in *Pinus palustris*: interactions with soil resource availability. *Plant cell environ.* 20, 461-471
- Rademacher IF, Nelson CJ. 2001. Nitrogen effects on leaf anatomy within the intercalary meristems of tall fescue leaf blades. *Ann Bot.* 88, 893-903
- Radoglou KM, Jarvis PG. 1992. The effects of CO₂ enrichment and nutrient supply on growth morphology and anatomy of *Phaseolus vulgaris* L. seedlings. *Ann Bot.* 70, 245-256
- Raines Ch. A, Lloyd J.C, Dyer T.A. 1999. New insights into the structure and function of sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, an important but neglected Calvin cycle enzyme. *J Exp Bot.* 50, 1-8
- Rawson HM, Gifford RM, Condon BN. 1995. Temperature gradient chambers for research on global environment change. Part I. Portable chambers for research on short-stature vegetation. *Plant cell environ.* 18, 1048-1054
- Robredo A, Pérez-López U, Sainz de la Maza H, González-Moro B, Lacuesta M, Mena-Petite A, Muñoz-Rueda A. 2007. Elevated CO₂ alleviates the impact of drought on barley improving water status by lowering stomatal conductance and delaying its effects on photosynthesis. *Env Exp Botany* 59, 252-263
- Roderick ML, Berry SL, Noble IR. 1999. The relationship between leaf composition and morphology at elevated CO₂ concentrations. *New Phytol.* 143,63-72
- Rogers A, Humphries SW 2000. A mechanistic evaluation of photosynthetic acclimation at elevated CO₂. *Glob change Biol.* 6, 1005- 1011
- Rogers A, Gibon Y, Stitt M, Morgan PB, Bernacchi CJ, Ort DR, Long SP 2006. Increased C availability at elevated carbon dioxide concentration improves N assimilation in a legume. *Plant Cell Environ.* 29, 1651-1658
- Rogers HH, Heck WW, Heagle AS. 1983. A field technique for the study of plant response to elevated carbon dioxide concentration. *J. Air Pollution Control* 33, 42-44
- Roulin S, Feller U. 1998. Dithiothreitol triggers photooxidative stress and fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in intact pea chloroplasts. *Plant Physiol Biochem.* 36, 849-856
- Sage RF. 1994. Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO₂: the gas exchange perspective. *Photosynth Res.* 39, 351-368
- Sage RF, Santrucek J, Grise DJ. 1995. Temperature effects on the photosynthetic response of C3 plants to long-term CO₂ enrichment. *Vegetatio* 121, 67-77.
- Sakakibara H. 2006. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol* 57,431-449
- Salamini F, Özkan H, Andrea Brandolini A, Ralf Schäfer-Preg R, Martin W. 2002. Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nature Reviews Genetics* 3, 429-441
- Salvucci ME, Portis Jr AR, Ogren WL. 1985. A soluble chloroplast protein catalyzes ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activation in vivo. *Photosynth Res.* 7,193-201

- Samuelson ME, Campbell WH, Larsson CM 1995. The influence of cytokinins in nitrate regulation of nitrate reductase activity and expression in barley. *Physiol Plant*. 93, 533-539
- Sánchez-díaz M, Aguirrolea J. 2000. Movimientos estomáticos y transpiración. *En: Fundamentos de Fisiología Vegetal*. J. Azcón-Bieto & M. Talón (Eds.) McGraw-Hill Interamericana, 32-43
- Sánchez-Rodríguez J, Martínez-Carrasco R, Pérez P. 1997. Photosynthetic electron transport and carbon-reduction-cycle enzyme activities under long-term drought stress in *Casuarina equisetifolia* Forst & Forst. *Photosynth Res*. 52, 255-262
- Saxe H, Ellsworth DS, Heath J. 1998. Tree and forest functioning in an enriched CO₂ atmosphere. *New Phytol*. 139, 395-436
- Schreiber, U, Schliwa, U, Bilger, W. 1986. Continuous recording of photochemical and non photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res*. 10, 51-62
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D. 2001. Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*. 52, 627-658
- Scott AC, Glasspool IJ. 2006. The diversification of Paleozoic fire systems and fluctuations in atmospheric oxygen concentrations. *PNAS* 103, 10861-10865
- Scott C, Lyons T, Bekker WA, Shen Y, Poulton SW, Chu X, Anbar AD. 2008. Tracing the stepwise oxygenation of the Proterozoic ocean. *Nature* 452
- Sharkey TD, Bernacchi CJ, Farquhar GD, Singsaas EL 2007. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant Cell Environ*. 30, 1035-1040
- Sharkey TD, Savich LV, Butz ND. 1991. Photometric method for routine determination of Kcat and carbamylation of Rubisco. *Photosynth Res*. 28, 41-48
- Sharkey TD. 1985. O₂-insensitive photosynthesis in C3 plants. Its occurrence and a possible explanation. *Plant Physiol* 78, 71-75
- 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. *Photosynth Res*. 52,27-38
- SIMIA-FAO (Servicio Mundial de Información y Alertas de la FAO). Perspectivas de cosechas y situación alimentaria. N° 1-3, feb-jul 2008 <http://www.fao.org/giews/>
- Simpson RJ, Lambers H, Dalling MJ 1982. Kinetin application to roots and its effect on uptake, translocation and distribution of nitrogen in wheat grown with a split root system. *Physiol Plant*. 56, 430- 435
- Sims DA, Seemann JR, Luo Y. 1998. Elevated CO₂ concentration has independent effects on expansion rates and thickness of soybean leaves across light and nitrogen gradients. *J Exp Bot*. 49, 583-591
- Smith BD. 1995. *The Emergence of Agriculture*. Scientific American Library, New York.
- Solomon S, *et al*. 2009. Irreversible climate change due to carbon dioxide emissions. *PNAS* 2009, 106,1704-1709; doi:10.1073/PNAS.0812721106

Bibliografia

- Spunda V, Kalina J, Cajanek M, Pavlickova H, Marek MV. 1998. Long-term exposure of Norway spruce to elevated CO₂ concentration induces changes in photosystem II mimicking an adaptation to increased irradiance. *J Plant Physiol.* 152, 413-419
- Stitt M, Krapp A. 1999. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background, *Plant Cell Environ.* 22, 583-621
- Stitt M. 1991. Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant Cell Environ.* 14, 741-62
- Strassemeier J, Forstreuter M. 1997. Parameterization of a leaf gas-exchange model for *Fagus sylvatica* L. using microcosms grown under ambient and elevated CO₂. *Landschaftsentwicklung and Umweltforschung* 107, 61-72
- Svensmark H. 2007. Cosmoclimatology: a new theory emerges. *Astronomy & Geophysics*, 48 N°1. DOI: 10.1111/j.1468-4004.2007.48118x
- Taiz L, Zeiger E. (Eds.) 2002. *Plant Physiology*, 3^a Ed. Sinauer Associates Inc.
- Takey K, Sakakibara H, Taniguchi M, Sugiyama M. 2001. Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant & Cell Physiol.* 42, 85-93
- Talbott LD, Srivastava A, Zeiger E. 1996. Stomata from growth-chamber grown *Vicia faba* have an enhanced sensitivity to CO₂ *Plant Cell Environ.* 19, 1188-94.
- Tanaka Y, Sano T, Tamaoki M, Nakajima N, Kondo N, Hasezawa S. 2006. Cytokinin and auxin inhibit abscisic acid-induced stomatal closure by enhancing ethylene production in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 57, 2259-2266
- Taub DR, Wang X. 2008. Why are nitrogen concentrations in plant tissues lower under elevated CO₂? a critical examination of the hypotheses. *J. Integrative Plant Biol.* 50, 1365-1374
- Tezara W, Mitchell V, Driscoll SP, Lawlor DW. 2002. Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. *J Exp Bot.* 53, 1781-1791
- Thorne GN. 1974. Physiology of grain yield of wheat and barley. Report of the Rothamsted Experimental Station for 1973, Part 2, 5-25
- Tissue DT, Thomas RB, Strain BR 1993. Long-term effects of elevated CO₂ and nutrients on photosynthesis and Rubisco in loblolly pine seedlings. *Plant Cell Environ.* 16, 859-865.
- Tomkins JP, Hall MH. 1991. Stimulation of alfalfa bud and shoot development with cytokinins. *Agronomy Journal* 83, 577-581
- Tripathi AK, Roberts CD, Eagle RA. 2009. Coupling of CO₂ and Ice Sheet Stability Over Major Climate Transitions of the Last 20 Million Years. *Science*: 1178296v1. DOI: 10.1126/science.1178296
- Tubiello FN, Amthor JS, Boote KJ, Donatelli M, Easterling W, Fischer G, Gifford RM, Howden M, Reilly J, Rosenzweig C. 2007. Crop response to elevated CO₂ and world food supply. A comment on "Food for Thought. . ." by Long *et al.*, *Science* 312,1918-1921, 2006. *European Journal of Agronomy* 26, 215-223

- Ulvskov P, Nielsen TH, Seiden P, Marcussen J. 1992. Cytokinins and leaf development in sweet pepper - *Capsicum annuum* - L. I. Spatial distribution of endogenous cytokinins in relation to leaf growth. *Planta* 188, 70- 77
- Uprety DC, Garg SC, Bisht BS, Maini HK, Dwivedi N, Paswan G, Raj A, Saxena DC. 2006. Carbon dioxide enrichment technologies for crop response studies. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 65
- Van Oosten JJ, Wilkins D, Besford R.T. 1994. Regulation of the expression of photosynthetic nuclear genes by high CO₂ is mimicked by carbohydrates: a mechanism for the acclimation of photosynthesis to high CO₂. *Plant Cell Environ.* 17, 913-923
- Van Oosten JJ, Besford RT 1995. Some relationships between the gas exchange, biochemistry and molecular biology of photosynthesis during leaf development of tomato plants after transfer to different carbon dioxide concentrations. *Plant Cell Environ.* 18, 1253-1256.
- Vavasseur A, Raghavendra AS. 2005. Tansley Review. Guard cell metabolism and CO₂ sensing. *New Phytol.* 165, 665-682
- Vitousek PM, Mooney HA, Lubchenco J, Jerry M. 1997. "Human Dominated Ecosystems," - Washington, D.C.: American Association for the Advancement of Science, 25 July 1997 -. *Science* 277, 486-499
- Volk M, Niklaus PA, Korner C. 2000. Soil moisture effects determine CO₂ responses of grassland species. *Oecologia* 125, 380-388
- Vysotskaya LB, kudoyarova GR, veselov S, JONES HG. 2003. Unusual stomatal behaviour on partial root excision in wheat seedlings. *Plant Cell Environ.* 27, 69-77.
- Wang KY, Kellömaki S. 1977. Effectos of elevated CO₂ and soil-nitrogen supply on chlorophyll fluorescence and gas exchange in scots pine, based on a branch-in-bag experiment. *New Phytol.* 136, 277-286
- Ward DA, Keys AJ. 1989. A comparison between the coupled spectrophotometric and uncoupled radiometric assays for RuBP carboxylase. *Photosynth Res.* 22, 167-171
- Ward P, Labandeira C, Laurin M, Berner RA. 2006. Confirmation of Romer's Gap as a low oxygen interval constraining the timing of initial arthropod and vertebrate terrestrialization. *PNAS.* 103 N°. 45 16818-16822
- Wheeler RM, Mackowiak CL, Yorio NC, Sager JC 1999. Effects of CO₂ on stomatal conductance, do stomata open at very high CO₂ concentrations?. *Ann Bot.* 83, 243-251
- Wingler A, von Schaewen A, Leegood RC, Lea PJ, Quick WP. 1998. regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars and light. *Plant Physiol.* 116, 329-335
- Wolfe DW, 1994. Physiological and growth responses to atmospheric carbon dioxide concentration. *En: Handbook of plant and crop science.* Pessarakli (ed.) 223-242
- Wolfe DW. 1998. Integration of photosynthetic acclimation to CO₂ at the whole plant level. *Glob change Biol.* N° 4, 879-893
- Wong SC, Cowan, IR, Farquhar GD. 1979. Stomatal conductance correlates with photosynthetic capacity. *Nature* 282, 424-426
- Woodrow IE, Berry JA. 1988. Enzymic regulation of photosynthetic CO₂ fixation in C3 plants. *Annu rev plant phys.* 39, 533-594

Bibliografia

- Woodward FI. 1987. Stomatal numbers are sensitive to increases in CO₂ from pre-industrial levels. *Nature* 327, 617-618
- Yang JC, ZhanG JH, Wang ZQ, Zhu QS, Liu LJ. 2003. Involvement of abscisic acid and cytokinins in the senescence and remobilization of carbon reserves in wheat subjected to water stress during grain filling. *Plant Cell Environ.* 226, 1621-1631
- Yin X. 2002. Response of leaf nitrogen concentration and specific leaf area to atmospheric CO₂ enrichment: a retrospective synthesis across 62 species. *Glob change Biol.* 8, 631-642
- Yin X, Lantinga E, Schapendonk AHCM, Zhong X. 2003. Some quantitative relationships between leaf area index and canopy nitrogen content and distribution. *Ann. Bot.* 91, 893 - 903
- Yong JWH, Wong SC, Letham DS, Hocart CH, Farquhar GD 2000. Effects of elevated [CO₂] and nitrogen nutrition on cytokinins in the xylem sap and leaves of cotton. *Plant Physiol.* 124, 767-780
- Zalasiewicz J, Williams M, Smith A, Barry TL, Coe AL, *et al.* 2008. Are we now living in the “Anthropocene”? *GSA Today*: 18, N° 2, 4-8
- Zeemann SC, Pilling E, Tiessen A, Kato L, Donald AM, Smith AM. 2002. Starch synthesis in *Arabidopsis*, granule synthesis, composition and structure. *Plant Physiol.* 129, 516-529
- Zhang LF, Rui Q, Xu LL. 2006. Degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in wheat leaves. *J. Integrative Plant Biol.* 47, 60-66
- Zhang SR, Dang QL. 2006. Effects of carbon dioxide concentration and nutrition on photosynthetic functions of white birch seedlings. *Tree Physiol.* 26, 1457-1467