



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Gramíneas perennes C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> para la producción de bioenergía en ambiente Mediterráneo

Claudia Vanina Arias

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

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

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

# **Gramíneas perennes C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> para la producción de bioenergía en ambiente Mediterráneo**

Memoria presentada por Claudia Vanina Arias para optar al título de Doctor por la Universitat de Barcelona. Este trabajo se enmarca dentro del programa de doctorado "Biología Vegetal", correspondiente al bienio 2011/2015 de la Universitat de Barcelona.

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

Doctoranda

Director de Tesis

Claudia Vanina Arias

Salvador Nogués Mestres

Barcelona, 16 de julio de 2015



---

**B** Universitat de Barcelona



*Sueña lo que desees soñar;  
ve dónde desees ir;  
sé lo que desees ser,  
porque solamente tienes una vida  
y una oportunidad para hacer las cosas que ambicionas.*

*Ten la suficiente felicidad que te haga dulce,  
los suficientes tropiezos que te hagan fuerte,  
la suficiente tristeza que te haga humano  
y la suficiente esperanza que te haga feliz.*

*Recuerda que la vida comienza con una sonrisa,  
crece con una ilusión  
y se fortalece con el anhelo de ser cada día una persona mejor, más  
sensible, más afectuosa y más amable.*

*(Autor desconocido)*



## *Agradecimientos*



Solía pensar que este día nunca llegaría, sin embargo aquí estoy, frente al ordenador escribiendo los agradecimientos y recordando a todas aquellas personas que de una forma u otra han contribuido para que esta tesis pueda llegar a su final.

En primer lugar, mi sincero agradecimiento al Dr. Salvador Nogués por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis, por su confianza, dedicación y por motivarme hacia el camino de la investigación.

A los docentes del Departamento de Biología Vegetal pero especialmente a profesores de la Unitat de Fisiología Vegetal que desde mis primeras horas en la Facultat allá por el año 2010, cuando comencé el máster de Agrobiología Vegetal, fueron muy amables conmigo; siempre predispuestos y atentos para ayudarme con lo que necesitará.

A la Carmencita y Esthercita, gracias por su ayuda cuando las he necesitado y sobre todo por su calidez humana, su complicidad y por las risas compartidas.

A mis compañeros de grupo: Salvador Aljazairi por su amistad, generosidad, paciencia y transmisión de conocimientos, a la Elena, Gladys, Alba y Carla. A Fernando Henrique Silva (hijo mío) y a Antoni Llabrés Payeras (Toni) por haberme dejado ser parte de su proceso de aprendizaje. A los chicos "Rice": Xavi, Camilo y Edu que me han enseñado muchas cosas nuevas de Word, Excel, Sigma Plot, EndNote.....etc. y sobretodo porque han hecho que estos últimos 4 meses fueran más llevadero y no tan estresantes, gracias chicos!

No puedo dejar de agradecer al resto de compañeros del departamento con quienes he compartido buenos momentos y charlas: Marta Renato, Jordi, Elenita, Boubker, Alcira, Samira, Tana, Ruth, Sara, Susan, Bang, Salvatorico, Jana Cela, Marta Pintó, Javier Miret, Daniela, Erola, Bárbara, Eva, Laura, Marta y Melani. Espero no olvidarme de ninguno y si es así perdón, es que son un montón y muchos ya no están en la facultad.

Un apartado muy especial para el personal del *Serveis de Camps Experimentals* (SCE): Don Ricardo Simonneau, Josep Matas y Xavier García. En primer lugar, debo agradecerles de todo corazón porque más que compañeros de trabajo fueron y son unos buenos amigos, con los que sé que puedo contar siempre. Gracias por todas las enseñanzas y reflexiones, por la confianza, por dejarme ser yo misma, por hacer que esta primera experiencia laboral de mi vida haya sido tan agradable y sobre todo productiva (he aprendido muchísimo), por darme el tiempo para hacer la tesis cuando lo necesitaba, por todos los cafés, los vinos y alfajores compartidos, por aguantar mis cambios de estado de ánimo (sobre todo Xavi), por ser como son, por todo esto y muchas cosas más, gracias!



Al personal de los *Centres Científics i Tecnològics* de la UB (CCiTUB)): Pilar Teixidor, Pili Rubio y Lourdes Berdié, por haberme brindado su ayuda y enseñanzas en el mundo de los isótopos estables. Y a las chicas de la Unidad de Microscopía en el Clínic, Almudena y Rosa por su amabilidad y atención.

A las profesoras Patricia Perissé y Rita Lovey de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba por los consejos y las palabras en el momento justo. Patry gracias por tu acompañamiento en esta etapa, tu amistad y por confiar en mí.

A los compis de piso, por aguantarme todos estos años sobre todo cuando llegaba cansada y de mal humor de la facultad, han formado parte de esta historia y me han brindado su amistad desinteresadamente, por eso y mucho más gracias de todo corazón a Lizeth, Sean Meéhan, Dani y Frens. Chávez no me olvido de ti, gracias por tu amistad.

Y si de alguien más debo estar eternamente agradecida, esos son mis padres. Es por ellos dos que hoy estoy aquí, que he llegado y conseguido todo lo que me propuesto, porque desde niña me han incentivado al estudio y a superarme tanto a nivel personal como profesional. Han apostado siempre por mí y espero hoy se sientan orgullosos, gracias por todo: gracias pá y gracias má. Los quiero!

También no puedo olvidarme del resto de la familia (hermano, tías, tíos y de todos mis queridos primos) y de mis amigos, tanto los allá como los que están aquí más cerca. Gracias por su cariño, por haber estado cuando los necesité, por sus palabras de aliento y por sentirse orgullosos de mí.

Y por último pero no menos importante, quiero agradecer a la persona más importante en mi vida: “el meu marit Alejandro”, quien es mi compañero de cada día, el que ha estado a mi lado apoyándome en cada minuto y animándome cuando parecía perder el rumbo. Gracias amor, gracias por dejarlo todo para vivir esta aventura, por consolarme cuando lo necesitaba (que han sido muchas veces), por las horas de cosecha y sobre todo por el *tupper* de cada día. Tenés un gran corazón y eres la persona más noble que conozco, por todo esto y mucho más te estaré agradecida toda mi vida.... Te Amo!

*Índice*



|   |    |
|---|----|
| Agradecimientos .....   | 5  |
| Abreviaciones y símbolos .....  | 15 |
| 1. Introducción .....   | 21 |
| 1.1. Demanda energética y cambio climático.....   | 23 |
| 1.2. La biomasa como fuente alternativa de energía .....  | 24 |
| 1.3. Especies candidatas para la producción de bioenergía en ambiente Mediterráneo .....                      | 25 |
| 1.4. Determinación de la composición isotópica para el estudio integrado del comportamiento fisiológico ..... | 27 |
| 1.4.1. Conceptos básicos sobre los isótopos estables.....   | 28 |
| 1.4.2. Composición isotópica de carbono .....   | 29 |
| 1.4.3. Composición isotópica de nitrógeno .....   | 32 |
| 2. Objetivos.....   | 33 |
| 2.1. Objetivo General .....   | 35 |
| 2.2. Objetivos Específicos.....   | 35 |
| 3. Materiales & Métodos .....   | 37 |
| 3.1. Material vegetal.....  | 40 |
| 3.2. Condiciones de cultivo y diseño experimental .....   | 40 |
| 3.2.1. Condiciones semi-controladas (Experimento I).....  | 40 |
| 3.2.2. Condiciones de campo (Experimento II) .....  | 41 |
| 3.2.3. Condiciones controladas (Experimento III) .....  | 43 |
| 3.3. Medidas de crecimiento .....   | 48 |
| 3.3.1. Determinación de la producción de materia seca (Exp. I y II) .....                                     | 48 |
| 3.3.2. Determinación del Área Foliar (Exp. I) .....   | 48 |
| 3.3.3. Relaciones entre fracciones (Exp. I) .....   | 48 |
| 3.3.4. Altura del tallo (Exp. I y II).....  | 49 |
| 3.3.5. Determinación de la Tasa de Crecimiento Relativo (Exp. I).....   | 49 |
| 3.3.6. Longitud de la radícula (Exp. IIIb) .....  | 50 |
| 3.4. Medidas fisiológicas.....  | 50 |
| 3.4.1. Medidas de intercambio de gases foliar (Exp. I y II).....  | 50 |
| 3.4.2. Medida de la fluorescencia modulada de las clorofilas (Exp. I y II) .....                              | 52 |
| 3.4.3. Contenido de clorofilas (Exp. II) .....  | 52 |
| 3.4.4. Eficiencia del uso del agua (Exp. I y II) .....  | 53 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.4.5. Eficiencia de uso del nitrógeno (Exp. I y II) .....  | 53  |
| 3.4.6. Tasa de respiración foliar (Exp. I) medida por consumo de O <sub>2</sub> .....   | 53  |
| 3.4.7. Contenido hídrico relativo (Exp. II) .....   | 55  |
| 3.5. Análisis isotópico .....   | 56  |
| 3.5.1. Procedimiento de marcaje isotópico con carbono 13 y nitrógeno 15 (Exp. I).....   | 56  |
| 3.5.2. Medidas isotópicas y análisis elemental (Exp. I y II) .....  | 57  |
| 3.5.3. Discriminación del <sup>13</sup> C (Exp. I y II) .....   | 63  |
| 3.5.4. Proporción de carbono Nuevo (Exp. I) .....   | 63  |
| 3.6. Estudio microscópico (Exp. IIIb).....  | 64  |
| 3.6.1. Preparación del material para estudios estructurales .....   | 64  |
| 3.6.1.1. Fijación, deshidratación e inclusión.....  | 64  |
| 3.6.1.2. Obtención de cortes .....  | 65  |
| 3.6.1.3. Tinción y contrastado .....  | 66  |
| 3.6.1.4. Observación y parámetros medidos.....  | 66  |
| 3.7. Análisis estadístico.....  | 66  |
| 3.7.1. Experimento I y II .....   | 66  |
| 3.7.2. Experimento III.....   | 67  |
| 4. Resultados.....  | 69  |
| 4.1. Experimento I: Caracterización fisiológica de las tres especies en ambiente controlado..   | 71  |
| 4.1.1. Medidas de crecimiento .....   | 71  |
| 4.1.2. Medidas fisiológicas .....   | 75  |
| 4.1.3. Análisis isotópico .....   | 80  |
| 4.2. Experimento II: Caracterización fisiológica de las tres especies en condiciones de clima Mediterráneo.....                                       | 88  |
| 4.2.1. Condiciones ambientales .....  | 88  |
| 4.2.2. Medidas de crecimiento .....   | 90  |
| 4.2.3. Medidas fisiológicas .....   | 93  |
| 4.2.4. Análisis isotópico .....   | 108 |
| 4.3. Experimento III: Ensayos de germinación en <i>Panicum virgatum</i> L. ....   | 112 |
| 4.3.1. Resultados del experimento IIIa: evaluación de diferentes métodos para romper la dormición en la semilla de <i>Panicum virgatum</i> L. ....    | 112 |
| 4.3.2. Resultados de experimento IIIb: Evaluación de la germinación de <i>Panicum virgatum</i> L. en condiciones de salinidad y déficit hídrico ..... | 115 |
| 5. Discusión .....  | 125 |

|   |     |
|---|-----|
| 5.1. Experimento I: Caracterización fisiológica de las tres especies en ambiente controlado   | 127 |
| 5.1.1. Medidas de crecimiento .....   | 127 |
| 5.1.2. Medidas de fisiológicas .....  | 129 |
| 5.1.3. Análisis Isotópico .....   | 132 |
| 5.2. Experimento II: Caracterización fisiológica de las tres especies en condiciones de clima Mediterráneo.....                         | 134 |
| 5.2.1. Medidas de crecimiento .....   | 134 |
| 5.2.2. Medidas de fisiológicas .....  | 135 |
| 5.3. Experimento III: Ensayos de germinación en <i>Panicum virgatum</i> L. ....   | 137 |
| 5.3.1. Experimento IIIa: Evaluación de diferentes métodos para romper la dormición en la semilla de <i>Panicum virgatum</i> L. ....     | 137 |
| 5.3.2. Experimento IIIb: Evaluación de la germinación de <i>Panicum virgatum</i> L. en condiciones de salinidad y déficit hídrico ..... | 139 |
| 6. Conclusiones .....   | 145 |
| 6.1. Experimento I.....   | 147 |
| 6.2. Experimento II.....  | 147 |
| 6.3. Experimento III.....   | 148 |
| 6.3.1. Experimento IIIa .....   | 148 |
| 6.3.2. Experimento IIIb.....  | 148 |
| 7. Bibliografía .....   | 151 |
| 8. Anexos.....  | 175 |



## *Abreviaciones y símbolos*





|                      |  |
|----------------------|--|
| $\%C_{\text{nuevo}}$ | Porcentaje de carbono nuevo  |
| 1G                   | Combustibles de primera (1 <sup>o</sup> ) generación   |
| 2G                   | Combustibles de segunda (2 <sup>o</sup> ) generación   |
| A                    | Tasa de asimilación neta de CO <sub>2</sub>  |
| ABA                  | Ácido abscísico  |
| AF                   | Área foliar ( <i>LA: Leaf área</i> )   |
| AFE                  | Área foliar específica ( <i>SLA: Specific leaf área</i> )  |
| $A_{\text{max}}$     | Tasa de Fotosíntesis neta máxima a saturación de CO <sub>2</sub> y luz                                       |
| AMF                  | Área de masa foliar ( <i>LMA: Leaf Mass Area</i> )   |
| $A_{\text{sat}}$     | Tasa de Fotosíntesis neta a saturación de luz  |
| C                    | Carbono  |
| C <sub>3</sub>       | Mecanismo fotosintético cuyo producto inmediato de la fijación del CO <sub>2</sub> es un ácido de 3 carbono  |
| C <sub>4</sub>       | Mecanismo fotosintético cuyo producto inmediato de la fijación del CO <sub>2</sub> es un ácido de 4 carbono  |
| $c_a$                | Concentración atmosférica de CO <sub>2</sub>   |
| CAM                  | Mecanismo ácido de las crasuláceas   |
| CCiTUB               | Centro Científico y Tecnológico de la Universidad de Barcelona   |
| CE                   | Conductividad eléctrica  |
| CH <sub>4</sub>      | Metano   |
| CHR                  | Contenido hídrico relativo ( <i>RWC: Relative Water Content</i> )  |
| $c_i$                | Concentración interna de CO <sub>2</sub>   |
| Cl <sub>2</sub> Ca   | Cloruro de calcio  |
| ClK                  | Cloruro de potasio   |
| ClNa                 | Cloruro de sodio   |
| CO <sub>2</sub>      | Dióxido de Carbono   |
| DPX                  | Depoxi   |
| EA-IRMS              | Analizador Elemental- Espectrómetro de masas de relación isotópica   |
| EUA                  | Eficiencia en el uso del agua  |
| EUN                  | Eficiencia de uso del nitrógeno  |
| $F_v/F_m$            | Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II   |
| $F_v'/F_m'$          | Eficiencia de la captura de la energía de excitación por los centros de reacción abiertos del fotosistema II |

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| GAs                             | Giberelinas  |
| GC-C-IRMS                       | Cromatografía de gases- Espectrómetro de masas de relación isotópica |
| GEI                             | Gases de efecto invernadero  |
| GRP                             | Gramíneas rizomatosas perennes                                       |
| $g_s$                           | Conductancia estomática  |
| HCO <sub>3</sub>                | Bicarbonato  |
| IAF                             | Índice de área foliar ( <i>LAI: Leaf Area Index</i> )                |
| INTA                            | Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria                        |
| IRGA                            | Analizador de Gas Infrarrojo ( <i>Infrared gas analyzer</i> )        |
| ISTA                            | International Seed Testing Association                               |
| $J_{max}$                       | La tasa máxima del transporte de electrones                          |
| MO                              | Materia orgánica   |
| MOT                             | Materia orgánica total   |
| MPa                             | Mega Pascales  |
| N                               | Nitrógeno  |
| N <sub>2</sub> O                | Óxido de nitrógeno   |
| NaClO                           | Hipoclorito de sodio   |
| NAD-ME                          | Enzima NAD-málico  |
| NADPH                           | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato                            |
| NADP-ME                         | Enzima NADP-málico   |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> | Nitrato de amonio  |
| PA                              | Parte aérea  |
| PAR <sub>i</sub>                | Radiación fotosintéticamente activa interceptada                     |
| PB                              | Tampón Fosfato sódico  |
| PCK                             | Enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa                              |
| PDB                             | Pee Dee Belemnite  |
| PEG                             | Polietilenglicol   |
| PEP                             | Fosfoenolpiruvato  |
| PEPC                            | Enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa                                 |
| PF                              | Peso fresco  |
| PFT                             | Peso fresco turgente   |
| PG                              | Porcentaje de Germinación (%)  |
| PG50                            | 50 % de germinación  |

|                |   |
|----------------|---|
| PG75           | 75 % de germinación   |
| PPFD           | Densidad de flujo fotónico fotosintético  |
| $\phi_{PSII}$  | Rendimiento cuántico relativo del transporte de electrones en el fotosistema II |
| PS             | Peso Seco   |
| PSII           | Fotosistema dos   |
| $qP$           | Quenching fotoquímico   |
| R/RL           | Rojo/Rojo Lejano  |
| R/S            | Relación Raíz/Tallo ( <i>R/S: Root/Shoot</i> )                                  |
| RAF            | Relación área foliar ( <i>LAR: Leaf Area Ratio</i> )                            |
| RPF            | Relación peso foliar ( <i>LWR: Leaf Weight Ratio</i> )                          |
| Rubisco        | Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa-Oxigenasa                                   |
| SCE            | Servicios de Campos Experimentales  |
| TCR            | Tasa de crecimiento relativo ( <i>RGR: Relative Growth Rate</i> )               |
| TES            | Solución buffer   |
| v/v            | volumen/volumen   |
| $V_{c, max}$   | Velocidad máxima de carboxilación   |
| VPD            | Déficit de presión parcial de vapor   |
| $\Delta^{13}C$ | Discriminación isotópica del $^{13}C$   |
| $\delta^{13}C$ | Composición isotópica de carbono 13   |
| $\delta^{15}N$ | Composición isotópica de nitrógeno 15   |



# *1. Introducción*



## 1.1. DEMANDA ENERGÉTICA Y CAMBIO CLIMÁTICO

A partir de la revolución industrial, se ha utilizado como principal fuente de energía los combustibles fósiles, especialmente petróleo, carbón y gas. Actualmente, dichos combustibles son recursos cada vez más limitados, difíciles de extraer, costosos y objeto de un intenso debate político (Charles *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar de esta situación, se estima que el consumo de energía mundial se incremente y que el precio del petróleo continúe creciendo (IEO, 2014). Parrish and Fike (2008) señalan que actualmente los dos aspectos de mayor importancia son: (i) la creciente amenaza del agotamiento de los combustibles fósiles y (ii) la necesidad de reducir las emisiones de CO<sub>2</sub>. Es por ello que la crisis energética mundial está impulsando la búsqueda de nuevas fuentes de energías renovables.

El uso de carbón y el petróleo no sólo significa el consumo insostenible de los recursos (y los precios en aumento), sino también que están directamente relacionados con el aumento de las emisiones de gases (principalmente CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O, etc.) responsables del calentamiento global (IPCC, 2014). La acumulación de estos gases en la atmósfera impide la salida del calor emitido desde la superficie terrestre lo que resulta en un mayor efecto invernadero, elevando la temperatura a nivel global. En los registros de los últimos 100 años se puede observar como los valores de temperatura han incrementado y se estiman aumentos de entre 4 y 5°C antes del 2100. A su vez, este escenario será acompañado de condiciones climáticas extremas como cambios en la cantidad y frecuencia de las precipitaciones, intensidad de ciclones tropicales, sequías y olas de calor (Smith *et al.*, 2012).

En la Unión Europea, por ejemplo, el sector del transporte es responsable de alrededor del 21% de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) y con el fin de poner freno al incremento de estas emisiones el uso de biocombustibles es considerado una solución clave para hacer frente a este conflicto (Fischer *et al.*, 2012). Además, el uso de biomasa como materia prima para la producción de biocombustibles podría contribuir hacia los objetivos de una reducción global de las emisiones de GEI, a través de la absorción fotosintética de CO<sub>2</sub> dentro del ciclo de crecimiento de la biomasa (Dunnett and Shah, 2007).



## 1.2. LA BIOMASA COMO FUENTE ALTERNATIVA DE ENERGÍA

Cuando hablamos de bioenergía hacemos referencia a la producción de alguna forma de energía renovable a partir de fuentes biológicas (Karp and Shield, 2008). Materiales derivados de los cultivos agrícolas, residuos, productos forestales, plantas acuáticas, fuentes animales y microbianas pueden ser combustionados directamente o después de procesos de conversión (hidrólisis, fermentación, etc...) para producir diferentes tipos de bioenergía como calor, etanol, energía mecánica o electricidad (Haberl *et al.*, 2010).

Dada la necesidad de desarrollar nuevas fuentes de energía alternativa, varias especies de plantas han sido estudiadas para la producción de biocombustibles (Alison and Raman, 2013). Fue así como surgieron los biocombustibles de 1º generación (1G), los cuales son producidos principalmente a partir de cultivos alimenticios como caña de azúcar, almidón de maíz, girasol, soja y sorgo (Sims *et al.*, 2006; Carpita and McCann, 2008). Sin embargo, la producción de biocombustibles a partir de este tipo cultivos se ha enfrentado a fuertes críticas en cuanto a su sostenibilidad y sobre todo a la desviación de alimentos que se produce fuera de la cadena alimentaria. Situación que lleva a la escasez de alimentos y aumentos en los precios de los productos básicos agrícolas. Por otro lado, la liberación de gases de efecto invernadero asociados con los cambios de uso del suelo ha llevado a discusiones polémicas sobre la eficacia de los biocombustibles de primera generación para reducir las emisiones globales de carbono (Naik *et al.*, 2010).

Debido a esta problemática, nuevas plantas sin valor nutricional son objeto de estudio para la producción de biocombustibles de 2º generación (2G), es decir producidos a partir de cultivos energéticos ricos en celulosa, hemicelulosa o lignina como por ejemplo algunas gramíneas perennes, especies forestales (como el álamo) y residuos de la industria de la madera (rica en lignocelulosa), aceite de palma o de *Jatropha curcas*, grasas animales, fritos, etc. (Lynd *et al.*, 2003). El desarrollo de los biocombustibles de segunda generación ofrece la oportunidad de evitar la competencia con la producción de alimentos y de utilizar materias primas para explotar los suelos no aptos para los cultivos de alimentos y generar mayor eficiencia de conversión (McLaughlin & Adams Kszos, 2005; Idris *et al.*, 2012).

### 1.3. ESPECIES CANDIDATAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOENERGÍA EN AMBIENTE MEDITERRÁNEO

Dentro de las características que hacen atractivas a las gramíneas perennes para la producción de biomasa están su alta capacidad fotosintética (mayor capacidad de fijar CO<sub>2</sub>), alto potencial de rendimiento, altos contenidos de lignina y celulosa en su biomasa y su impacto ambiental positivo en comparación con otros cultivos anuales (Jaradat, 2010; Ceotto *et al.*, 2013). Las gramíneas perennes no son vistas como competencia por las tierras agrícolas, ya que pueden cultivarse en tierras marginales o degradadas y donde la rentabilidad económica del agricultor y el capital no son sostenibles (Lewandowski *et al.*, 2003). Es decir, pueden cultivarse en tierras marginales y a su vez proporcionan beneficios en términos de estructura y estabilidad del suelo (por ejemplo, reduciendo la pérdida de suelo debido a la erosión y la escorrentía) y la calidad del suelo (por ejemplo, aumento de la fertilidad del suelo a nivel de la materia orgánica y la retención de nutrientes) (Angelini *et al.*, 2009).

El clima Mediterráneo se caracteriza por presentar veranos calurosos y secos, y la mayoría de los modelos de calentamiento global muestran que el suministro de agua será mucho menor y las temperaturas del aire significativamente mayor en el corto plazo, sobre todo durante el verano (Rosenzweig and Tubiello, 1997; Metzger *et al.*, 2005). Esto plantea serias amenazas para varios cultivos convencionales, en particular en las zonas marginales. La disminución en la disponibilidad de agua, como consecuencia del cambio climático, conduciría a períodos de sequía más prolongados y, por lo tanto reducción de la disponibilidad o de los recursos hídricos sobre todo en regiones de clima Mediterráneo (IPCC, 2014). En la región de la Península Ibérica y más concreto en España, las precipitaciones son el factor climático más importante en la formación de los ecosistemas y sobretodo en la limitación de rendimiento de los cultivos (Nogués *et al.*, 2001; Araus *et al.*, 2002). La sequía afecta rendimiento de los cultivos más que cualquier otro estrés ambiental generando un impacto negativo en el crecimiento, desarrollo, supervivencia y productividad de la planta (Cattivelli *et al.*, 2008). A su vez, el aumento en la frecuencia de los periodos de sequía suele traer como consecuencia la aparición de problemas de salinidad en el suelo ya que está asociado con un mal manejo del agua de riego (Ghannoum, 2009). Por lo tanto, el estudio de cultivos alternativos como las gramíneas perennes en ambientes desfavorables se vuelve interesante por su mayor tolerancia a la baja disponibilidad de agua y a la salinidad en comparación con los cultivos tradicionales.

En Europa, cerca de 20 especies perennes se han probado y tres gramíneas rizomatosas perennes (GRP): *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. han sido elegidas para los programas de investigación más amplios (Lewandowski *et al.*, 2003; Heaton *et al.*, 2004), y sobre las cuales hemos realizado nuestro estudio. Las tres especies elegidas, se caracterizan por ser gramíneas herbáceas y del tipo perenne ya que su cultivo puede durar entre 15 y 20 años. Su crecimiento se da durante la estación cálida (primavera- verano) y poseen una alta productividad de biomasa.

***Panicum virgatum* L.:** en inglés "switchgrass", pertenece a la familia Poaceae, subfamilia Panicoideae. Es una especie nativa de América del Norte (difundida desde Quebec hasta México), que puede extenderse hasta América Central. Esta especie se utiliza para producción de forrajes y como cobertura para conservación de suelo y agua (Whyte *et al.*, 1959). En los últimos años se incrementó su investigación para la producción de biocombustibles (Sanderson *et al.*, 1996). Es una especie con vía fotosintética C4 y del subtipo NAD-ME, existen dos ecotipos reconocidos: *upland* y *lowland*, los primeros son de menor altura y generalmente se encuentran en tierras altas de menor fertilidad y más secas; mientras que los *lowland* puede alcanzar hasta 2 metros de altura, son muy robustos, y se encuentran en zonas bajas, húmedas y de alta fertilidad. Esta especie puede tolerar varios tipos de estrés como bajas temperaturas, sequía, salinidad y suelos ácidos (Alexopoulou *et al.*, 2008). Su forma de reproducción es por rizomas pero también se reproduce por semillas, a diferencia de las otras dos gramíneas que presentan semillas no viables. Actualmente, se cultiva mediante la siembra de sus semillas. Sin embargo, presenta inconvenientes al momento de establecimiento del cultivo (Checovich and Ruiz, 2012), ya que sus semillas presentan dormición al momento de la cosecha, resultando el retraso en la germinación y emergencia de las plántulas (Duclos *et al.*, 2013). Diferentes estudios se han llevado a cabo usando distintos métodos para romper la dormición y así aumentar el porcentaje de germinación, como escarificación ácida, hipoclorito de sodio y prechilling, priming, etc. (Moser and Vogel, 1995; Haynes *et al.* 1997).

***Miscanthus x giganteus* Greef & Deuter ex Hodkinson & Renvoize:** conocida como "miscantus", pertenece a la familia Poaceae, subfamilia Panicoideae. Es originaria del Este de Asia y fue utilizada antiguamente en Japón como forraje y para producción de calor a partir de su combustión. Es una especie con vía fotosintética C4 y del subtipo NADP-ME. Es un híbrido triploide estéril, que viene del cruce entre *M. sacchariflorus* (tetraploide) y *M. sinensis* (diploide).

*M. sacchariflorus* se reproduce por rizomas y caracteriza por tener un rápido crecimiento y alta productividad en áreas cálidas y húmedas (Greef and Deuter, 1993). La reproducción de *M. sinensis* es principalmente es por semillas y se encuentra en ambientes fríos. Por lo cual, miscantus heredó buena tolerancia al frío y actualmente es la única especie C4 más productiva en las regiones frías (Naidu and Long, 2004). Pudiendo desarrollarse bajo temperaturas menores de 10°C y mantener altas tasas fotosintéticas bajo temperaturas entre 14 y 25 °C (Naidu, 2003). Diferentes estudios indican que esta tolerancia a bajas temperaturas de se debe a la protección del fotosistema II mediante el incremento del contenido de zeaxantina en la hoja a menos de 14°C (Farage *et al*, 2006).

**Arundo donax L.:** conocida como "caña común o carrizo", pertenece a la familia Poaceae, subfamilia Arundineae. Es originaria de Asia y se encuentra ampliamente distribuida en los países alrededor del mar Mediterráneo, así como en diferentes áreas del mundo (Ceotto *et al.*, 2013). Es una especie con vía fotosintética C3 pero presenta altas tasas de asimilación fotosintéticas y un potencial fotosintético insaturado comparado con las C4, que no son usuales para las C3 (Rossa *et al.*, 1998). Es una de las plantas herbáceas mayor tamaño del género y una de las gramíneas más grandes del mundo, se ha utilizado antiguamente para el control de la erosión y forraje para el ganado (Dudley, 2000). Es una planta estéril por lo que se reproduce por rizomas (Pilu *et al.*, 2012), por ello se la considera una especie invasora (Angelini *et al.*, 2009). Es capaz de crecer en una amplia gama de condiciones ambientales aunque es considerada una planta acuática emergente (Cook, 1990), sin embargo una vez establecida no precisa de un aporte constante de agua, por lo que puede crecer en lugares secos.

#### **1.4. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN ISOTÓPICA PARA EL ESTUDIO INTEGRADO DEL COMPORTAMIENTO FISIOLÓGICO**

A pesar del creciente interés en el uso de cultivos de biomasa para la producción de energía, se sabe poco sobre la biología básica, fisiología y ecología de muchas de estas especies. Por lo tanto, existe la necesidad de caracterizarlas desde sus tolerancias fisiológicas y ambientales para identificar los ecosistemas más adecuados para la producción agronómica (Barney *et al.*, 2009; Chaves *et al.*, 2009). Además, entender cómo varía el rendimiento de la biomasa según la gestión de los recursos y las condiciones ambientales, en las distintas especies, es de primordial importancia para la industria de los biocombustibles (Lasorella *et al*, 2011; Kiniry *et al*, 2012).

En este trabajo, además de estudiar diferentes parámetros de crecimiento y fisiológicos ampliamente conocidos como: altura, área foliar, rendimiento de la biomasa (PS), tasas de asimilación de CO<sub>2</sub>, respuesta a la luz, fluorescencia, contenido de clorofilas, contenido hídrico del agua, etc., nos planteamos el uso de isótopos estables para el estudio integrado del comportamiento fisiológico, ya que los isótopos estables pueden dar información sobre las respuestas de las plantas, y sus estrategias, a los diferentes parámetros ambientales (Nogués *et al.*, 2008).

#### 1.4.1. Conceptos básicos sobre los isótopos estables

Los isótopos son átomos de un mismo elemento químico que poseen el mismo número de protones pero difieren en el número de neutrones. Dentro de cada elemento, encontramos una familia de isótopos radiactivos o inestables, que se desintegran espontáneamente en un cierto periodo de tiempo y los no radiactivos o estables, que permanecen inalterados; estos últimos serán nuestro objeto de estudio. La mayoría de los elementos presenta diferentes isótopos estables, los de mayor peso molecular o pesados, que se encuentran en bajas concentraciones y los de menor peso o ligeros están en mayor concentración en la naturaleza.

La variación en la abundancia de estos isótopos se determina mediante espectrometría de masas y se define según la notación diferencial:

$$\delta^{\text{nX}} (\text{‰}) = \left( \frac{\text{R}_{\text{muestra}}}{\text{R}_{\text{estándar}}} - 1 \right) * 1000$$

Donde  $\delta^{\text{nX}}$  es la composición isotópica referida a un estándar expresada en tantos por mil y  $\text{R}_{\text{muestra}}$  y  $\text{R}_{\text{estándar}}$  representan las proporciones isotópicas absolutas del isótopo  $^{\text{n}}\text{X}$  respecto del cociente de un patrón internacional de referencia específico para cada elemento (Tabla 1). De este modo, cuando el valor de  $\delta$  es positivo indica que el material estudiado está enriquecido en el isótopo pesado respecto al patrón utilizado, y cuando es negativo denota empobrecimiento respecto al patrón internacional.

**Tabla 1.1.** Estándares, notación diferencial y abundancia natural de los isótopos de C y N utilizados en ecofisiología.

| Relación Isotópica                  | <sup>13</sup> C/ <sup>12</sup> C | <sup>15</sup> N/ <sup>14</sup> N |
|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Estándar                            | PDB <sup>b</sup>                 | N <sub>2</sub> atmosférico       |
| Notación diferencial                | δ <sup>13</sup> C                | δ <sup>15</sup> N                |
| Abundancia natural (%) <sup>a</sup> | 1,1                              | 0,37                             |

<sup>a</sup> Abundancia media del isótopo pesado respecto al total de elemento.

<sup>b</sup> PDB, fósil Pee Dee Belemnite, actualmente sustituido por Viena PDB.

Por diferencia de masa atómica, el isótopo pesado difunde o reacciona a una menor velocidad que el ligero en cualquier transformación o reacción biogeoquímica, lo que explica el enriquecimiento o empobrecimiento relativo de un isótopo con respecto al otro, este proceso es denominado: **Fraccionamiento o Discriminación isotópica (Δ)** y queda definido como la desviación respecto de la unidad:

$$\Delta (\text{‰}) = \alpha - 1 = (\delta_r - \delta_p / (1 + \delta_p / 1000))$$

Siendo α el efecto isotópico asociado a la reacción y δ<sub>r</sub> y δ<sub>p</sub> la composición isotópica de los reactivos y del producto respectivamente (Farquhar *et al.*, 1989).

#### 1.4.2. Composición isotópica de carbono

El carbono es el elemento más abundante en la tierra y es un componente esencial de los seres vivos, ya que interviene en procesos imprescindibles para la vida. En la biosfera coexisten de forma natural dos isótopos de carbono: <sup>12</sup>C (98,99 %) y <sup>13</sup>C (1,11%).

Antiguamente, en ausencia de actividad industrial el valor de la composición isotópica <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> del aire era de -6,4 ‰ (Chen *et al.*, 2006), en la actualidad presenta valores alrededor de -8 y -10 ‰, esto se debe a que a medida que aumenta la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmosfera varia la composición isotópica. Estos valores más negativos se correlacionan con la mayor presencia de <sup>12</sup>C en el aire debido a la mayor discriminación contra el <sup>13</sup>C en el proceso de fotosíntesis, la deforestación antropogénica y el uso de combustibles fósiles de origen orgánico cuyo CO<sub>2</sub>

producido viene de la combustión de plantas con una  $\delta^{13}\text{C}$  entre -28 y -30 ‰ (Farquhar *et al.*, 1989). La variación de la composición isotópica depende de la especie analizada, de la anatomía foliar, las condiciones ambientales y los componentes genéticos de cada especie (Brugnoli and Farquhar, 2000). Las plantas están normalmente empobrecidas en el isótopo más pesado ( $^{13}\text{C}$ ) en comparación con el  $\text{CO}_2$  atmosférico (fuente C), a causa de los procesos físicos y químicos que participan en la absorción de  $\text{CO}_2$ . La  $\delta^{13}\text{C}$  de las plantas varía entre -7 y -35 ‰, en función de su metabolismo fotosintético ( $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$  y CAM). A su vez, el  $\delta^{13}\text{C}$  puede verse afectado por la discriminación durante la respiración mitocondrial (3-6‰), ya que los substratos producto de la fotosíntesis enriquecidos/empobrecidos con  $^{13}\text{C}$  son liberados durante la respiración en la oscuridad y alterando la composición isotópica de la planta (Ghashghaie *et al.*, 2003), los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  del aire respirado varían entre -20 ‰ y -30 ‰. También existe una discriminación pos-fotosintética en los procesos de translocación y partición de asimilados según Badeck *et al.* (2005). En las plantas  $\text{C}_3$ ,  $\delta^{13}\text{C}$  valores en su materia orgánica (MO) varían entre -22 y -35 ‰ y en plantas  $\text{C}_4$   $\delta^{13}\text{C}$  los valores están menos empobrecido en  $^{13}\text{C}$ , con valores que oscilan entre los -9 y -17 ‰ (Fig. 1).

La discriminación isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) en plantas se calcula a partir  $\delta^{13}\text{C}_a$  y  $\delta^{13}\text{C}_p$  (Farquhar *et al.*, 1989) como:

$$\Delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \delta^{13}\text{C}_a - \delta^{13}\text{C}_p / (1 + \delta^{13}\text{C}_p / 1000)$$

Donde  $\delta^{13}\text{C}_a$  y  $\delta^{13}\text{C}_p$  indican la composición isotópica del aire y de la planta,  $a$  y  $b$  la discriminación por difusión en el aire y la carboxilación, respectivamente.

En las especies  $\text{C}_3$  este empobrecimiento se debe a la menor difusión estomática del  $^{13}\text{C}$  y a la preferencia de la Rubisco por el isótopo más ligero ( $^{12}\text{C}$ ), siendo la discriminación contra el  $^{13}\text{C}$  de la Rubisco mayor (-29 ‰ in vitro) que la discriminación sobre la difusión estomática (-4,4 ‰).

Mientras que en las plantas  $\text{C}_4$ , la absorción de  $\text{CO}_2$  implica varios pasos: (i) la difusión de  $\text{CO}_2$  desde el aire al interior a través de la capa límite y los estomas, (ii) la hidratación de  $\text{CO}_2$  a  $\text{HCO}_3^-$  (bicarbonato) por la anhidrasa carbónica, que reacciona con el fosfoenolpiruvato (PEP) con la ayuda de la PEP carboxilasa (PEPC) para producir oxalacetato (ácido de  $\text{C}_4$ ) en el mesófilo, (iii) el oxalacetato se convierte en otros ácidos  $\text{C}_4$  (malato, aspartato o alanina) que difunden en las células de la vaina del haz y se descarboxila a  $\text{CO}_2$  para su posterior fijación por la Rubisco y seguir el resto del ciclo  $\text{C}_3$ . El modelo que describe la discriminación isótopo de carbono en hojas de las plantas  $\text{C}_4$  según Farquhar *et al.* (1982) viene dada por:

$$\Delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \alpha (C_a - C_i / C_a) + (b_4 + b_3\Phi) * C_i / C_a$$

Esta expresión se deriva de la  $\Delta^{13}\text{C}$  descrita para plantas C3, en el que el término b es sustituido por  $(b_4 + b_3\Phi)$ , donde  $\Phi$  representa permeabilidad y la proporción de C fijado por PEPC que posteriormente se escapa hacia fuera de la vaina del haz permitiendo la discriminación por Rubisco en la vaina del haz. El término  $(b_4 + b_3\Phi)$  es menor de  $b_3$ , y por lo tanto el efecto de fraccionamiento es potencialmente más grande por Rubisco (Bowman *et al.*, 1989). Esto explica los valores más bajos de  $\delta^{13}\text{C}$  en C4 plantas en comparación con las plantas C3.

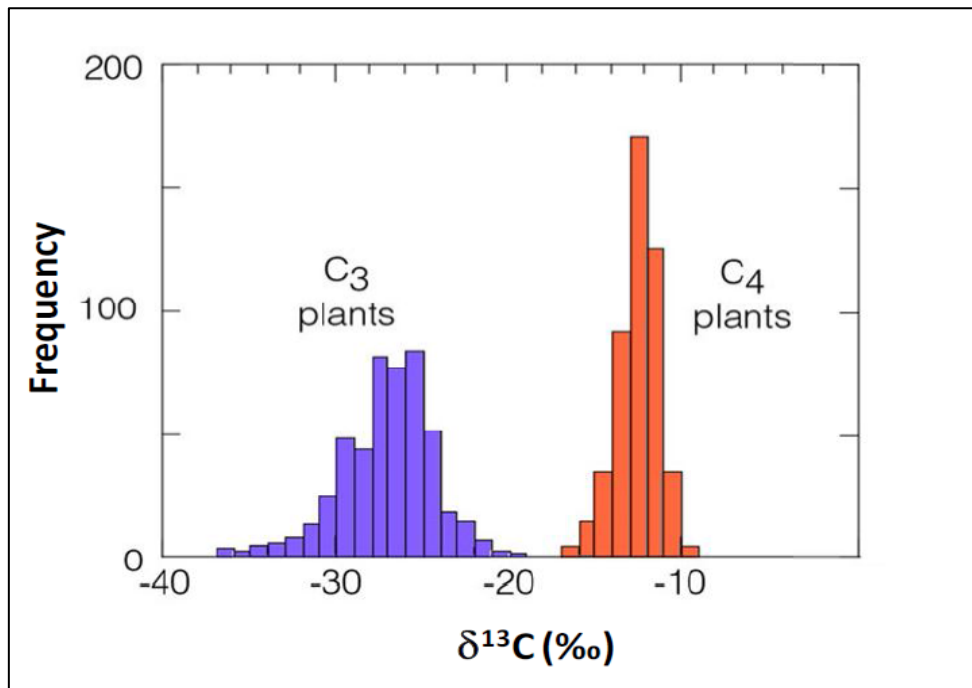


Figura 1.1. Variación en la composición isotópica de  $^{13}\text{C}$  en plantas C3 y C4. Adaptado de Cerling *et al.* (1997).



### 1.4.3. Composición isotópica de nitrógeno

El nitrógeno se encuentra en forma orgánica e inorgánica, y circula a través de procesos complejos en el ecosistema terrestre. Las diferentes reacciones que tienen lugar en el ciclo del N generan variaciones en los valores de los isótopos  $^{15}\text{N}$  y  $^{14}\text{N}$ , esta variabilidad en la abundancia natural del  $^{15}\text{N}$  en las plantas terrestres puede aportar información valiosa del ciclo del N en el ecosistema.

El fraccionamiento isotópico del N en la planta es resultado de i) la asimilación de  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NH}_4^+$ , ii) la translocación hacia las hojas y iii) el metabolismo del N en el citoplasma. La incorporación de  $\text{NO}_3^-$  tiene un efecto isotópico de 0,3 y 3 ‰. Se ha observado que este fraccionamiento disminuye con la edad de la planta, las intensidades de luz y aumenta con el aumento de las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  en una planta madura y en un suelo normal la discriminación contra  $^{15}\text{N}$  es pequeña. La variabilidad entre órganos es bastante homogénea, con excepción en los nódulos bacterianos, por ej.: hojas -1,5, frutos y flor -1,1, tallos -3,1, raíz -3,3 y nódulo +6.3‰. El rango de valores de composición isotópica del  $^{15}\text{N}$  varía entre -10 y 10 ‰ (Tcherkez and Hodges, 2008).

La composición isotópica del N en la planta y en la hoja están determinadas por el cociente isotópico entre la fuente de N externo y los mecanismos dentro de la planta, como resultado de la combinación de i)  $\delta^{15}\text{N}$  del aporte de N, ii) la relación entre los aportes de N y la demanda, iii) la proporción del N derivada de la descomposición de materia orgánica y iv) procesos de discriminación durante la absorción, reducción, asimilación y redistribución en la planta. En consecuencia, la  $\delta^{15}\text{N}$  en suelo y plantas aumenta con el exceso de N en ausencia de fertilización mineral y el N derivado de fertilización orgánica resulta enriquecido en  $\delta^{15}\text{N}$  (Evans, 2001).

La composición isotópica de  $^{15}\text{N}$  se calcula como:

$$\delta^{15}\text{N}_a = \delta^{15}\text{N}_e - (\Delta_u + ni/ne * (\Delta_r - \Delta_u))$$

Donde  $\delta^{15}\text{N}_a$  y  $\delta^{15}\text{N}_e$  son la composición isotópica del N asimilado y del nitrato externo del suelo respectivamente,  $ni$  hace referencia a concentración interna de N y  $ne$  a la externa de nitrato en el suelo;  $\Delta_u$  es el fraccionamiento asociado a la absorción y  $\Delta_r$  a la asimilación (reducción) (Tcherkez and Hodges, 2008).

## *2. Objetivos*



## 2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis fue caracterizar el comportamiento de las gramíneas perennes *Panicum virgatum* L. (C4), *Miscanthus x giganteus* (C4) y *Arundo donax* L. (C3), para la producción de bioenergía en ambiente Mediterráneo.

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para lograr este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar el comportamiento de estas tres especies bajo condiciones controladas mediante el estudio de diferentes parámetros fisiológicos y de crecimiento.
- Estudiar la partición del C asimilado y el N fijado entre cada órgano (hojas, tallos, raíces y rizomas) de la planta y el metabolismo respiratorio mediante el uso de isótopos estables ( $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ ).
- Estudiar las respuestas de estas especies a condiciones ambientales de clima Mediterráneo a partir de diferentes parámetros fisiológicos y de crecimiento.
- Aumentar el porcentaje de germinación mediante la evaluación de diferentes métodos pre-germinativo para romper la dormición en semillas de *Panicum virgatum* L.
- Estudiar la germinación y la respuesta morfo-anatómica de la raíz de *Panicum virgatum* L. bajo condiciones de salinidad y estrés hídrico.



### *3. Materiales & Métodos*



**Tabla 3.1.** Resumen de Experimentos realizados

| Experimentos | Material vegetal  | Condiciones Experimentales  | Tratamientos   | Estudios  |
|--------------|---|---|--|---|
| I            | <i>Panicum virgatum</i> L.<br><i>Miscanthus x giganteus</i><br><i>Arundo donax</i> L. | Semi-controladas:<br>Invernadero y<br>Cámara de ambiente controlado | Condiciones de crecimiento: óptimas  | Parámetros de crecimiento<br>Parámetros fisiológicos<br>Análisis isotópico    |
| II           | <i>Panicum virgatum</i> L.<br><i>Miscanthus x giganteus</i><br><i>Arundo donax</i> L. | No controladas: Campo   | Condiciones de crecimiento: clima<br>Mediterráneo: Riego y seco                    | Parámetros de crecimiento<br>Parámetros fisiológicos<br>Análisis isotópico    |
| III          | <i>Panicum virgatum</i> L.  | Controladas: Cámara de germinación                                  | IIIa. Métodos pre-germinativos<br>IIIb. Condiciones de salinidad y déficit hídrico | Parámetros de crecimiento<br>Parámetros fisiológicos<br>Parámetros anatómicos |



### 3.1. MATERIAL VEGETAL

Las especies estudiadas fueron: *Panicum virgatum* L. "switchgrass", *Miscanthus x giganteus* Greef et Deu "miscantus" y *Arundo donax* L. "caña común", las cuales han sido descritas anteriormente en la introducción. Las semillas de *Panicum virgatum* L. cultivar Álamo correspondiente al subtipo "low-land", fueron donadas por el INTA Anguil (La Pampa, Argentina). Las plántulas de *Miscanthus x giganteus* y de *Arundo donax* L. fueron obtenidas de micropropagación "in vitro" por la empresa Piccoplant (Pflanzenvertrieb und Verkauf GmbH, Oldenburg, Alemania).

Los diferentes experimentos se realizaron en las instalaciones del Servicio de Campos Experimentales (SCE) de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.

### 3.2. CONDICIONES DE CULTIVO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 3.2.1. Condiciones semi-controladas (Experimento I)

El primer experimento se llevó a cabo con las tres especies y en condiciones semi-controladas. Las plantas crecieron en invernadero durante 6 meses, y luego se colocaron en cámaras de ambiente controlado para realizar un marcaje isotópico con carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ ) y nitrógeno 15 ( $^{15}\text{N}$ ).

Las plántulas de switchgrass, se obtuvieron a partir de la siembra de semillas en cápsula de Petri sobre papel de filtro humedecido bajo las condiciones recomendadas, para esta especie, según las reglas ISTA (2012). Las plántulas de las tres especies se trasplantaron en tiestos de 9 litros (una planta por tiesto), llenos con sustrato 3:1:1 (turba: perlita: vermiculita). Se colocaron nueve tiestos de cada especie sobre las mesas en el invernadero (Fig. 3.1). Las condiciones ambientales durante todo el periodo de crecimiento fueron: temperatura 25/18°C (día/noche) y el VPD 0,75 kPa. El rango de humedad relativa estuvo entre 65-70% y el máximo PPFD fue ~1000  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . El riego fue localizado, mediante goteros y se suministró solución Hoagland completa (Hoagland and Arnon, 1950).

Para realizar el marcaje isotópico, descrito en la sección 3.5.1, las plantas se retiraron del invernadero y se colocaron en una cámara de ambiente controlado (Conviron E15, Controlled Environments Ltd., Winnipeg, Manitoba, Canadá). Las condiciones de la cámara fueron las siguientes: temperatura de 25/18°C (luz/oscuridad), humedad relativa entre 60-70%, PPFD de 400  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  durante un período de 16 horas de luz y una concentración de 400  $\mu\text{mol CO}_2$

mol<sup>-1</sup>. Se realizaron tres riegos manuales, con solución Hoagland completa (Hoagland and Arnon, 1950), para mantener al 100% la capacidad de contenedor durante el período en el que las plantas permanecieron en la cámara (10 días).



**Figura 3.1.** Plantas de *Panicum virgatum* L. sobre mesa de cultivo, en el interior del invernadero del SCE.

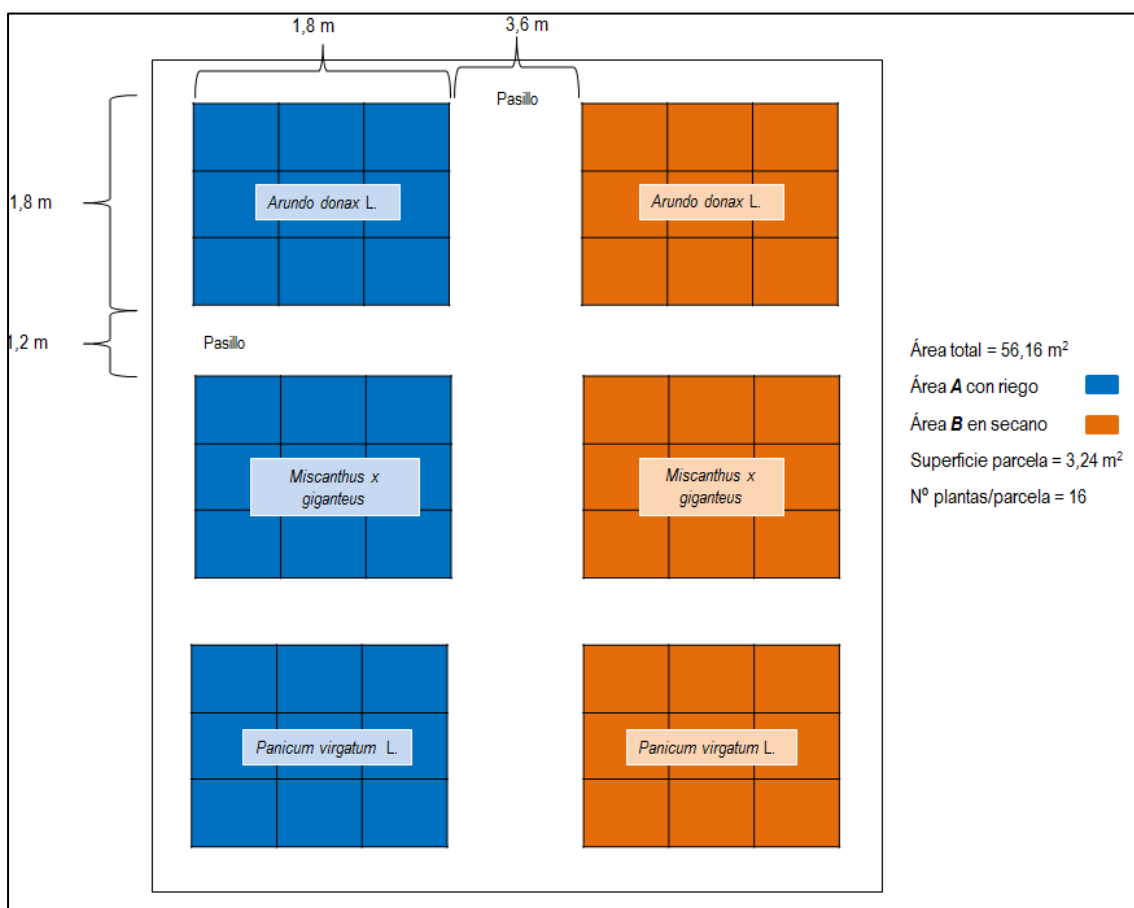
### **3.2.2. Condiciones de campo (Experimento II)**

El segundo experimento se realizó también con las tres especies, pero en parcelas de suelo de cultivo en el SCE. Este experimento se llevó adelante durante dos años consecutivos (2013-2014).

Para ello, se preparó el terreno mediante fresado con tractor, rastrillado y nivelado. En un terreno de 56,16 m<sup>2</sup> se marcaron dos áreas (A y B) de 28,08 m<sup>2</sup> cada una. Se dividió cada área en 3 parcelas (una por cada especie) de 1,8m x 1,8m (3,24 m<sup>2</sup>), trasplantándose en cada parcela 16 plantas (Fig. 3.2).

El área A correspondió al tratamiento que denominaremos: condiciones de regadío consistente en 50 mm H<sub>2</sub>O mes<sup>-1</sup>, con riego localizado mediante goteros, durante los meses de primavera-verano (junio, julio, agosto y septiembre). Y el área B correspondió al tratamiento que denominaremos: condiciones de secano el cual no tuvo riego suplementario, sólo recibió agua de lluvia precipitada.

Se llevaron adelante diferentes mediciones relacionadas con el crecimiento y el comportamiento fisiológico de las plantas a lo largo de todo el experimento. La primera medición, que llamaremos T0, se realizó en primavera (mes de mayo). En este momento (inicial) las plantas ya habían rebrotado y no se les añadió riego suplementario, es decir rebrotaron solo con el agua de lluvia caída hasta ese momento. Luego de T0, se fue aplicando riego solo en la parcela A. La segunda medición que llamaremos T1 se realizó aproximadamente un mes después de T0, es decir a comienzos del verano y T2 dos meses después de T0, es decir hacia finales de verano.



**Figura 3.2.** Diagrama de la superficie y distribución de las parcelas para cada especie, en la superficie de suelo cultivable del SCE.

Los datos meteorológicos de temperatura y humedad en las parcelas experimentales del SCE durante el período de ensayo, fueron facilitados por el Observatorio Meteorológico Departamento de Astronomía y Meteorología de la Facultad de Física de la Universidad de Barcelona. Los datos de precipitación caída se obtuvieron a partir de los registros del pluviómetro ubicado (a 10 metros del ensayo) en el propio SCE. El tipo de suelo del SCE, corresponde a un suelo tipo E (luvisol cálcico), arcilloso; derivado de sedimentos coluviales y aluviales característicos de suelos mediterráneos y subtropicales (Sauras *et al.*, 1999). Al comienzo de la estación de primavera, se fertilizaron ambas parcelas (A y B) con NPK (15:15:15) con una dosis de 5 g m<sup>-2</sup>.

### **3.2.3. Condiciones controladas (Experimento III)**

En el tercer experimento se trabajó sólo con la especie *Panicum virgatum* L. cv. Álamo, ya que como se mencionó anteriormente, es la única de las tres especies que posee semillas viables para germinación. Para lograr los objetivos planteados en este estudio de germinación se llevaron a cabo dos experimentos que denominaremos IIIa y IIIb. En el primero, se intentó buscar un método práctico para la ruptura de la dormición de las semillas de esta especie; y en el segundo, evaluar el proceso de germinación de las semillas en condiciones de salinidad y déficit hídrico.

Los ensayos se realizaron con un lote de semillas cosechadas manualmente en diciembre 2013, provenientes de la parcela A correspondiente al Experimento II de Condiciones de Campo. Estas semillas se almacenaron en sobres de papel a temperatura ambiente ( $22\pm 2$  °C) y  $40\pm 5$  % de humedad durante tres meses hasta el inicio del experimento (marzo 2014). Previo a cada uno de los experimentos se realizó la desinfección de las semillas. Se sumergieron (dentro de una fina malla) en solución NaOCl al 5% (v/v) en agitación durante 15 minutos, seguido de cuatro lavados en agua destilada estéril de 5 minutos cada uno. Todo el material utilizado (frascos de vidrio, papel de filtro, pinzas, etc.) se esterilizó en autoclave.

La germinación se evaluó en cápsulas de Petri de 9 cm de diámetro (100 semillas/ cápsula y tres réplicas de cada tratamiento) sobre doble capa de papel filtro humedecido con 2,5 ml de solución control (agua destilada) y problema. Las cápsulas se sellaron con parafilm para evitar la evaporación y contaminación. Cada ensayo fue repetido tres veces en el tiempo. Los recuentos de germinación se realizaron, bajo lupa de aumento, cada tres días durante 28 días según lo recomendado por ISTA (2012) para esta especie, a excepción del experimento IIIb que duró 35 días. Esta prolongación del período de ensayo, de 7 días, se realizó para comprobar la viabilidad

de las semillas no germinadas hasta el día 28 de ensayo. Se consideró semilla germinada cuando la radícula emergida había alcanzado 2 mm de longitud y una vez contabilizadas fueron descartadas. En el caso de las semillas que fueron sometidas a oscuridad (Tratamiento 8 del Exp. IIIa), el recuento se hizo en una cámara oscura, bajo luz verde de seguridad. Esta luz verde de seguridad está formada por fluorescentes de luz de día (Sylvania F18W 154 Day light) recubiertos por dos capas de filtro verde N° 90 Rosco Supergel.

Después de cada recuento, las cápsulas, se colocaron nuevamente en la cámara de germinación distribuyéndose de forma aleatoria por la variabilidad de la irradiancia lumínica en la cámara.

A partir de los resultados obtenidos en cada recuento, se determinó:

- Porcentaje de germinación (PG %) al final del experimento usando la fórmula:

$$PG (\%) = \frac{\text{Número de semillas germinadas}}{\text{Número total de semillas}} \times 100$$

- Velocidad de germinación (día en el que llega al PG50 % y PG75 %)
- La relación entre el PG % y la velocidad de germinación.

Los dos últimos puntos se obtuvieron mediante un Análisis de supervivencia (Ver apartado 3.7.2 Análisis Estadístico).

### 3.2.3.1. Experimento IIIa: Evaluación de diferentes métodos para romper la dormición de las semillas de *Panicum virgatum* L.

Con el objetivo de seleccionar la mejor alternativa para romper la dormición de las semillas y favorecer un mayor PG, se sometieron las mismas a los siguientes métodos pre-germinativos:

**Prechilling o estratificación:** las cápsulas con semillas sobre papel humedecido con 2,5 ml de agua destilada, se almacenaron en cámara fría a  $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de tiempo determinado.

**Priming o hidropriming con deshidratación:** las cápsulas con semillas sobre papel humedecido con 2,5 ml agua destilada, se almacenaron a temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante un periodo de tiempo determinado y luego se deshidrataron en estufa a  $40^{\circ}\text{C}$  con ventilación durante dos horas.

**Combinación de prechilling y priming:** las cápsulas se almacenaron en cámara fría a  $5^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de tiempo determinado y luego se deshidrataron en estufa a  $40^{\circ}\text{C}$  con ventilación durante dos horas.

Los tratamientos realizados fueron (Tabla 3.1):

- Control y tratamiento 7: las semillas se pusieron a germinar directamente en la cámara de germinación, sin aplicar ningún método pre-germinativo. La diferencia entre ambos tratamientos fueron las condiciones de temperatura y luz de la cámara de germinación.
- Tratamientos 1 y 2 se les realizó priming, durante 24 y 48 horas respectivamente.
- Tratamientos 3 y 5 se combinaron los dos métodos (prechilling y priming), es decir se mantuvieron las semillas sobre papel humedecido a  $5^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 7 y 14 días respectivamente y luego de ese periodo se procedió a su secado.
- Tratamiento 4 y 8 se les realizó prechilling durante 7 días. La diferencia entre ambos tratamientos fueron las condiciones de temperatura y luz de la cámara de germinación.
- Tratamiento 6 se realizó prechilling durante 14 días.

Luego de aplicar los diferentes métodos pre-germinativos, las cápsulas se colocaron en cámaras de germinación (ASL Ibercex, Madrid, España). Las condiciones de temperatura en la cámara de germinación para los tratamientos 1; 2; 3; 4; 6 y control fueron:

- Alternancia de temperatura  $22^{\circ}\text{C}/16^{\circ}\text{C}$ .

Para los tratamientos 7 y 8 fueron las sugeridas por ISTA (2012) para ésta especie:

- Alternancia de temperatura  $30^{\circ}\text{C}/15^{\circ}\text{C}$ .

La alternancia de luz en las cámaras fue de 16 h luz /8 h oscuridad para todos los tratamientos excepto el n° 8, el cual se mantuvo en oscuridad. Las cápsulas de Petri fueron cubiertas con papel de aluminio para evitar la luz y de esta manera poder evaluar la influencia del fotoperiodo sobre la germinación. La luz en la cámara de germinación fue proporcionada por seis tubos fluorescentes color blanco frío, marca OSRAM L36W/840 (Múnich, Alemania), la cantidad de luz recibida a la altura de las cápsulas fue de  $76 \pm 5,88 \mu\text{mol PAR m}^2 \text{ s}^{-1}$  y la calidad de la luz o relación Rojo/Rojo Lejano (R/RL) de  $7,46 \pm 0,21$  medido con un espectrómetro UniSpec (Spectral Analysis System, PP System).

**Tabla 3.2.** Tratamientos pre-germinativos aplicados y condiciones de la cámara de germinación ensayadas para romper la dormición de las semillas de *Panicum virgatum* L. Prechilling o estratificación: consistió en colocar las semillas sobre papel humedecido con 2,5 ml de agua destilada en cápsula de Petri, se almacenaron en cámara fría a  $5^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de tiempo determinado. Priming o hidropriming con deshidratación: las cápsulas con semillas sobre papel humedecido con 2,5 ml agua destilada, se almacenaron a temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante un periodo de tiempo determinado y luego se deshidrataron en estufa a  $40^{\circ}\text{C}$  con ventilación durante dos horas. Combinación de prechilling y priming: las cápsulas se almacenaron en cámara fría a  $5^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de tiempo determinado y luego se deshidrataron en estufa a  $40^{\circ}\text{C}$  con ventilación durante dos horas.

| Tratamientos | Métodos pre-germinativos |         |          | Condiciones de la cámara de germinación |                       |
|--------------|--------------------------|---------|----------|---|-----------------------|
|              | Prechilling              | Priming | Duración | Temperatura                             | Fotoperiodo           |
| Control      | -                        | -       | -        | $22^{\circ}\text{C}/16^{\circ}\text{C}$ | 16h luz/ 8h oscuridad |
| 1            | -                        | +       | 24 horas | $22^{\circ}\text{C}/16^{\circ}\text{C}$ | 16h luz/ 8h oscuridad |
| 2            | -                        | +       | 48 horas | $22^{\circ}\text{C}/16^{\circ}\text{C}$ | 16h luz/ 8h oscuridad |
| 3            | +                        | +       | 7 días   | $22^{\circ}\text{C}/16^{\circ}\text{C}$ | 16h luz/ 8h oscuridad |
| 4            | +                        | -       | 7 días   | $22^{\circ}\text{C}/16^{\circ}\text{C}$ | 16h luz/ 8h oscuridad |
| 5            | +                        | +       | 14 días  | $22^{\circ}\text{C}/16^{\circ}\text{C}$ | 16h luz/ 8h oscuridad |
| 6            | +                        | -       | 14 días  | $22^{\circ}\text{C}/16^{\circ}\text{C}$ | 16h luz/ 8h oscuridad |
| 7            | -                        | -       | -        | $30^{\circ}\text{C}/15^{\circ}\text{C}$ | 16h luz/ 8h oscuridad |
| 8            | +                        | -       | 7 días   | $30^{\circ}\text{C}/15^{\circ}\text{C}$ | Oscuridad             |

### 3.2.3.2. Experimento IIIb: Evaluación de la germinación de *Panicum virgatum* L. en condiciones de salinidad y déficit hídrico

El segundo experimento consistió en germinar las semillas simulando condiciones de estrés salino y déficit hídrico, para ello se utilizaron soluciones de cloruro de sodio (ClNa) según metodología de Sosa *et al.* (2005) y se prepararon soluciones con Polietilenglicol (PEG8000), según la fórmula de Michel (1983).

Los tratamientos realizados fueron:

- Control: las semillas fueron sembradas sobre papel humedecido con 2,5 ml de agua destilada.

- Tratamiento de salinidad: semillas sembradas sobre papel humedecido con 2,5 ml de ClNa con un potencial hídrico de -0,8 MPa.
- Tratamiento de salinidad: semillas sembradas sobre papel humedecido con 2,5 ml de ClNa con un potencial hídrico de -1,2 MPa.
- Tratamiento de déficit hídrico: semillas sembradas sobre papel humedecido con 2,5 ml de solución PEG 8000 con un potencial hídrico de -0,8 MPa
- Tratamiento de déficit hídrico: semillas sembradas sobre papel humedecido con 2,5 ml de solución PEG 8000 con un potencial hídrico de -1,2 MPa.

Las condiciones de pre-germinación y de germinación que se implementaron fueron las sugeridas por ISTA (2012) para esta especie. Se aplicó a las semillas el método pre-germinativo: prechilling 5 °C durante 7 días, el papel fue humedecido con la solución correspondiente a cada tratamiento durante este periodo. Para el tratamiento con PEG 8000 como es un carbohidrato cuya dilución se ve afectado por la temperatura, se prepararon dos soluciones de PEG 8000, una para el período de prechilling a 5°C y otra para el período de germinación a 30°C.

Luego las cápsulas se colocaron en la cámara de germinación (ASL, Ibercex, Madrid, España) con las siguientes condiciones:

- Alternancia de temperatura 30°C/15°C.
- Alternancia de luz (16 h luz /8 h oscuridad).

Cada semana se cambió el papel de filtro, para mantener los potenciales osmóticos iniciales de las soluciones problemas. Durante un periodo de 28 días se realizó el seguimiento y conteo de las semillas germinadas para cada tratamiento. Una vez finalizado este periodo, se procedió a comprobar la viabilidad de las semillas que no habían germinado; para ello las semillas se colocaron entre papeles con agua destilada y se dejaron en la cámara durante 7 días más, manteniendo las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo en la cámara de germinación.

En este experimento se colocaron dos cápsulas de Petri extra, de cada tratamiento, para realizar mediciones de la longitud de la radícula emergida (Apartado 3.3.7) y también para estudios morfo-anatómicos de la misma (Apartado 3.6).



### 3.3. MEDIDAS DE CRECIMIENTO

Para evaluar el crecimiento se midieron parámetros de biomasa y se utilizaron diferentes técnicas. Algunas medidas se realizaron durante el experimento y otras al final de cada experimento.

#### 3.3.1. Determinación de la producción de materia seca (Exp. I y II)

Se determinó el contenido de materia seca de los diferentes órganos de la planta. Se definieron cuatro: hoja, tallo, raíz y rizoma. Una vez cortado el material se procedió a su secado colocándolo en estufa a 60 °C hasta obtener un peso constante (~72 h) y luego fue pesado en balanza de precisión. Las raíces fueron lavadas previamente para extraer el sustrato antes de procesarlas.

Los parámetros medidos fueron:

- **Peso Seco Hoja (g):** representa el PS total de hojas.
- **Peso Seco Tallo (g):** representa el PS total de tallos.
- **Peso Seco Parte aérea (g):** representa el PS total de la parte aérea del material vegetal (PS de las hojas + PS de los tallos).
- **Peso Seco Raíz (g):** representa el PS total de las raíces.
- **Peso Seco Rizoma (g):** representa el PS total de los rizomas.
- **Peso Seco Parte subterránea (g):** representa el PS de las raíz más el PS de rizomas.
- **Peso Seco Total (g):** PS total del material vegetal (PS parte aérea + PS parte subterránea).

#### 3.3.2. Determinación del Área Foliar (Exp. I)

El área foliar o **AF** (cm<sup>2</sup>) fue cuantificada mediante escáner de imagen plano (Hewlett- Packard ScanJet modelo Ilcx, San Diego, EE.UU). Posteriormente, las imágenes se analizaron con el programa de procesamiento de imágenes IMAGE (Nogués *et al.*, 1998).

#### 3.3.3. Relaciones entre fracciones (Exp. I)

Una vez obtenida el área foliar y el peso seco del material vegetal, se calcularon los siguientes parámetros:

- **Área foliar específica o AFE ( $m^2 kg^{-1}$ ):** es el coeficiente ente el área foliar y el peso de la hoja.
- **Relación peso foliar o RPF ( $kg kg^{-1}$ ):** es el coeficiente entre el peso seco de las hojas y el peso total de la planta, el cual representa la proporción de biomasa que invierten las plantas en la formación de hojas.
- **Relación área foliar o RAF ( $m^2 kg^{-1}$ ):** es igual al producto de AFE por RPF, es decir es el coeficiente entre el área foliar y el peso total de la planta, que es parcialmente determinada por la traslocación (RPF) y por la morfología de la hoja (AFE).
- **Índice de área foliar o IAF:** es el área total de tejido foliar por unidad de área de superficie del terreno. Es una cantidad adimensional que caracteriza la canopia de una planta (Watson, 1947).
- **Área de masa foliar o AMF ( $g m^{-2}$ ):** es el coeficiente entre el peso seco foliar y el área foliar (Poorter et al., 2009).
- **Relación Parte subterránea / Parte aérea:** es el coeficiente entre el peso seco de la parte subterránea (raíz + rizoma) y el peso seco de la parte aérea.

#### 3.3.4. Altura del tallo (Exp. I y II)

Se midió la altura de los tallos (desde la base hasta la última hoja completamente desplegada en el tallo) con regla graduada.

#### 3.3.5. Determinación de la Tasa de Crecimiento Relativo (Exp. I)

La **tasa de crecimiento relativo o TCR** ( $mg g^{-1} día^{-1}$ ) es uno de los parámetros más importante y clásicos del análisis del crecimiento, el cual refleja la tasa de incremento relativo de biomasa por unidad de tiempo. Fue descrita por Wolfe et al. (1998) y se define como:

$$TCR = (\ln PS2 - \ln PS1) / (t2 - t1) = (mg g^{-1} día^{-1})$$

Dónde: PS2 y PS1 = son el peso seco (en gramos) de la planta al final y al inicio de cada período respectivamente, mientras que t2 y t1 = corresponden al tiempo (en días) transcurridos desde la primera y la última medición.

Este parámetro fue medido durante el período de crecimiento de las plantas en el invernadero, con un intervalo de un mes entre cada medición.

### **3.3.6. Longitud de la radícula (Exp. IIIb)**

Se tomaron medidas de la longitud (mm) de la primera raíz adventicia a los 10 y 20 días de emergida con una regla graduada y se tomaron fotografías de las plántulas bajo los diferentes tratamientos.

## **3.4. MEDIDAS FISIOLÓGICAS**

### **3.4.1. Medidas de intercambio de gases foliar (Exp. I y II)**

La medida de intercambio de gases se llevó a cabo utilizando un sistema de medida de fotosíntesis portátil Li-6400 (Li-cor Inc., Lincoln, Nebraska, USA). Este sistema consta de una pinza con una cámara que posee de un analizador de gases infrarrojo o IRGA. Debido a que tanto el CO<sub>2</sub> como el vapor de H<sub>2</sub>O se absorben en la banda del infrarrojo el analizador mide la concentración de ambos. La cámara del IRGA es doble, donde se analiza el aire de referencia, es decir, el aire que entra a la cámara donde se coloca la hoja, y por otro lado mide el aire que sale de la misma (Sistema abierto). De esta manera se pueden detectar las variaciones de estos gases debidos al metabolismo de la hoja. Por otro lado, posee una consola central donde se pueden modular y programar parámetros como la luz, la temperatura, la humedad y la concentración de CO<sub>2</sub> en los que se desea que se encuentre la hoja para su estudio.

Algunos de los datos más relevantes que podemos obtener son por ejemplo: la tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub> ( $A$ ) es la resultante de la diferencia entre CO<sub>2</sub> que entra y el que sale de la cámara, en función del flujo de aire que circula y del área foliar en el interior de la pinza. Integrando diversas medidas como la temperatura foliar y la del aire, se pueden obtener otros parámetros como son la conductancia estomática ( $g_s$ ) o la concentración interna de CO<sub>2</sub> ( $c_i$ ).

Medidas de respuestas fisiológicas de las plantas a las diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> (Curvas  $A/c_i$ ) y a diferentes niveles de luz (Curvas  $A/PAR_i$ ) se tomaron en la última hoja completamente expandida. Las mediciones se realizaron en tres plantas de cada especie y tratamiento.

#### 3.4.1.1 Curvas de respuesta al CO<sub>2</sub>

Se efectuaron curvas de respuesta al CO<sub>2</sub> ( $A/c_i$ ), sometiendo las hojas a diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> ambiental ( $c_a$ ). Las medidas comenzaron en 400  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ , y fueron disminuyendo gradualmente a 250, 100, 50, hasta 0  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ . Luego se reinició en 400  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  y fueron aumentando gradualmente a 750, 1000 hasta 1200  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ , esperando entre cada medida unos 10 minutos para la estabilización y aclimatación de la hoja a cada concentración de CO<sub>2</sub>. Durante la medición se mantuvo la temperatura foliar a 25°C, 21% O<sub>2</sub> y un PPFd saturante de 1200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  con un 10% de luz azul.

#### 3.4.1.2. Parámetros obtenidos de las curvas de CO<sub>2</sub>

Las curvas  $A/c_i$  permitieron el cálculo de diferentes parámetros fotosintéticos usando ecuaciones desarrolladas por Von Caemmerer y Farquhar (1981):

- **Tasa de Fotosíntesis neta a saturación de luz ( $A_{sat}$ ):** es la medición de la tasa de fijación CO<sub>2</sub> neta en condiciones ambientales de luz saturante.
- **Tasa de Fotosíntesis neta máxima a saturación de CO<sub>2</sub> y luz ( $A_{max}$ ):** es la medición de la tasa de fotosíntesis en condiciones saturante de CO<sub>2</sub> y luz.

Y por otro lado, se obtuvieron estimaciones mediante el método de McMurtrie y Wang (1993) para los siguientes parámetros:

- **Velocidad máxima de carboxilación ( $V_{c,max}$ ):** es la medida de la tasa máxima carboxilación o eficiencia máxima de carboxilación. Se calcula como la pendiente inicial de la porción lineal de la curva.
- **La tasa máxima del transporte de electrones ( $J_{max}$ ):** es la medida de la tasa máxima de transporte de electrones que contribuyen a la regeneración de la enzima RuBP basado en el requisito NADPH. Se estimó a partir de la asíntota horizontal de cada curva  $A/c_i$  individual. Es un buen indicador del funcionamiento del transporte electrónico en las membranas tilacoidales bajo diferentes situaciones de estrés.

#### 3.4.1.3. Curvas de respuesta a la Luz

Además de la respuesta al CO<sub>2</sub>, se realizaron curvas de respuesta de la fotosíntesis a la luz absorbida ( $A/PAR_i$ ). Las curvas comenzaron a niveles máximos de luz de 2000  $\mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , y fueron disminuyendo gradualmente a 1200, 600, 300, 100, 50, 30 hasta 0  $\mu\text{mol PAR m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

La concentración de CO<sub>2</sub> se mantuvo a 400 μmol mol<sup>-1</sup>, la temperatura foliar a 25°C y 21% de O<sub>2</sub>.

### 3.4.2. Medida de la fluorescencia modulada de las clorofilas (Exp. I y II)

Las medidas de emisión de fluorescencia de las clorofilas se realizaron simultáneamente con la medida de intercambio de gases, en las mismas hojas, utilizando la cámara de fluorescencia que esta acoplada al cabezal del Li- 6400 (LFC 6400-40).

#### 3.4.2.1 Parámetros de la fluorescencia de la clorofila

Los parámetros obtenidos fueron los siguientes:

- **Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ):** es una medida de la eficiencia máxima del fotosistema II si todos los centros están abiertos. Para obtener el valor de este parámetro, la hoja a medir se mantuvo en oscuridad durante 30 minutos.
- **Rendimiento cuántico relativo del transporte de electrones en el fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ):** representa la proporción de luz absorbida por las clorofilas que se aprovecha a nivel fotoquímico y la cantidad de energía involucrada en la transferencia de energía.
- **Eficiencia de la captura de la energía de excitación por los centros de reacción abiertos del fotosistema II ( $F_v'/F_m'$ ):** da información de la variación de la eficiencia fotoquímica bajo condiciones limitantes de luz y sus valores varían entre 0 y 1.  $F_v'/F_m'$  se calcula mediante la fluorescencia variable ( $F_v' = F_m' - F_o'$ ) y la fluorescencia máxima de la hoja adaptada a la luz ( $F_m'$ ).
- **Quenching Fotoquímico ( $qP$ ):** representa la porción de centros de reacción abiertos dentro de PSII. Los cambios en el  $qP$  son el resultado de la saturación de la fotosíntesis por la luz.

#### 3.4.3 Contenido de clorofilas (Exp. II)

El contenido de clorofila es un indicador del estado de salud de las plantas. Las mediciones se realizaron con un medidor portátil de clorofila (Minolta SPAD 502 Meter, Plainfield, IL, USA), las mediciones se realizaron en la última hoja expandida de la planta.

#### 3.4.4. Eficiencia del uso del agua (Exp. I y II)

La eficiencia del uso del agua (**EUA**) fue estimada a partir de la metodología según Medrano *et al.* (2007). Para obtener este parámetro se utilizaron los valores de intercambio de gases que estiman la eficiencia del uso del agua de la hoja, ya que permiten determinar la transpiración (salida de agua de la planta) y la fotosíntesis neta (entrada neta de CO<sub>2</sub> en las hojas). La eficiencia en el uso del agua a escala foliar es el cociente entre la asimilación de CO<sub>2</sub> y la conductancia estomática:

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

#### 3.4.5. Eficiencia de uso del nitrógeno (Exp. I y II)

Una vez que las plantas fueron cosechadas y cuantificado su contenido de nitrógeno, se calculó la eficiencia de uso del nitrógeno o EUN como:

$$\text{EUN} = \text{Contenido N en la planta (g)} / \text{Peso seco (g)}$$

#### 3.4.6. Tasa de respiración foliar (Exp. I) medida por consumo de O<sub>2</sub>

Las tasas de respiración del tejido foliar se determinaron mediante el uso de un Electrodo de oxígeno polarográfico tipo Clark de fase líquida (Clark *et al.*, 1953), (Qubit Systems, Kingston, Canadá). Este sistema consiste en:

- Dos electrodos, uno es un cátodo de platino y el otro un ánodo de plata.
- Una membrana permeable al oxígeno (pero impermeable a otros gases).
- Una solución electrolítica conteniendo (ClK) que une al ánodo y al cátodo.

Sobre el electrodo hay una cámara donde se coloca la solución buffer y la muestra vegetal. Envolviendo la cámara hay una camisa de agua termostaticada, la cual permite controlar la temperatura durante las medidas (se trabajó a temperatura ambiente 25°C) (Fig. 3.3). La solución se mantiene en agitación continua mediante un agitador magnético, mientras en el interior de la cámara queda aislado del exterior gracias a un tapón.

El oxígeno disuelto en la solución difunde a través de la membrana hacia el interior del electrodo donde se produce una reacción redox: el cátodo de platino se reduce por acción del oxígeno,

mientras que el ánodo de plata se oxida y ambas reacciones generan una corriente que es la base de la medida. Es decir, cuando se le aplica un voltaje polarizador de 0,7 Voltios a los electrodos se genera una corriente eléctrica entre el ánodo y el cátodo, cuya la intensidad es directamente proporcional a la concentración de  $O_2$  disuelto de la solución.

Para realizar esta medición se seleccionaron hojas jóvenes y totalmente expandidas de 3 individuos de cada especie. Antes de las lecturas, se midieron aproximadamente  $10\text{ cm}^2$  de tejido foliar, cortándolos en pequeños fragmentos. Éstos se colocaron en una solución de  $Cl_2Ca$  (0,2 mM) en oscuridad durante 10-15 minutos, para estabilizar las paredes vegetales dañadas por las heridas del corte. Luego, se introdujeron en 5 ml de solución tampón de respiración (TES 20 mM +  $Cl_2Ca$  2 mM, pH 7,2).

Para calcular la respiración, cada medida se hizo bajo condiciones de oscuridad (el electrodo se cubrió con un paño negro). Cada muestra se dejó respirando aproximadamente 4 minutos y después se calculó la tasa de respiración a partir de la pendiente registrada, en el programa LoggerPro, el volumen de la solución buffer y la cantidad de material introducido en la cámara. Inicialmente las tasas de respiración se obtuvieron en relación al peso seco de la muestra ( $\mu\text{mol } O_2 \text{ kg}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), determinando el peso seco de las muestras con una balanza de precisión de 0,1 mg, después de secarse en estufa a  $60^\circ\text{C}$  hasta peso constante. Las tasas de respiración por área foliar ( $\mu\text{mol } O_2 \text{ kg}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) se calcularon a partir del peso específico foliar de cada hoja.

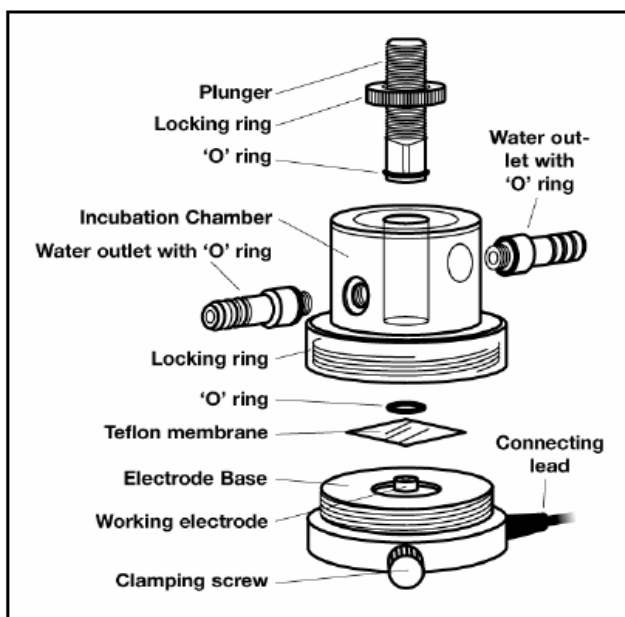


Figura 3.3. Electrodo de  $O_2$  de fase líquida y cámara de medida termostatazada.

### 3.4.7. Contenido hídrico relativo (Exp. II)

Contenido hídrico relativo o **CHR**: es un indicador del estado de la planta, en términos de hidratación celular (Slatyer, 1967).

Procedimiento para obtener valores de CHR:

- Se pesaron y etiquetaron tubos Eppendorff de 0,2 ml (5 réplicas por muestra).
- Se seleccionaron hojas jóvenes y desarrolladas de la planta, de las cuales se seccionaron discos, de 8mm de diámetro (0,5 cm<sup>2</sup>), de tejido y se colocaron en el tubo de 0,2 ml.
- Se pesaron los tubos con la muestra en el interior y este valor lo llamamos Peso Fresco (PF).
- Se transfirieron los discos de hoja a tubos de 1,5 ml con agua desionizada. Los tubos se dejaron durante 24 horas en una cámara fría a 4°C para permitir la absorción de agua por el tejido.
- Luego se retiraron las secciones de tejido vegetal de los tubos con agua y con papel, se retiró el exceso de agua sobre su superficie.
- Se transfirieron las muestras a sus tubos originales (0,2 ml) y se pesó de nuevo, dando el Peso Fresco Turgente (PFT).
- Luego se colocaron los tubos abiertos en una estufa a 60° C durante 48 horas.
- Después del secado se volvió a pesar el tejido para obtener el valor de Peso Seco (PS).

Contenido hídrico relativo se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\text{CHR} = \frac{\text{PF} - \text{PS}}{\text{PFT} - \text{PS}} \times 100$$



### 3.5. ANÁLISIS ISOTÓPICO

#### 3.5.1. Procedimiento de marcaje isotópico con carbono 13 y nitrógeno 15 (Exp. I)

Las plantas estuvieron creciendo en el invernadero durante 6 meses. Para el marcaje se trasladaron una cámara de ambiente controlado (Convicon E15, Controlled Environments Ltd., Winnipeg, Manitoba, Canadá) (Fig. 3.4 A). Se dejaron durante una semana en la cámara para su aclimatación y luego se procedió a realizar el doble marcaje durante 3 días (para cada especie) y una vez finalizado el mismo las plantas fueron llevadas nuevamente al invernadero.

Para el análisis isotópico se tomaron muestras de gases y de la materia orgánica total (MOT) en diferentes momentos:

- T0: pre-marcaje
- T1: a las 24 horas de finalizado el marcaje.
- T2: a los 7 días de finalizado el marcaje.

##### 3.5.1.1. Marcaje isotópico con carbono 13

El marcaje isotópico de carbono se logró mediante la modificación de la composición isotópica del CO<sub>2</sub> del aire de la cámara con carbono 13 (<sup>13</sup>C). El procedimiento consistió en inyectar a la cámara dióxido de carbono enriquecido en un 99% con <sup>13</sup>C (Air Liquid, Grigny, France) (Cambridge Isotope Laboratory, USA) (Fig. 3.4 B). Se tomó el CO<sub>2</sub> enriquecido (<sup>13</sup>C) de la botella con una jeringa de 50 ml (SGE, Ringwood, Australia) (Fig. 3.4 C) y mediante un perfusor (IV Perfusor, Spritze) se dosificó la entrada de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> (12,5 ml <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>/ h) a la cámara durante los 3 días de marcaje (Fig. 3.4 D).

##### 3.5.1.2. Marcaje isotópico con nitrógeno 15

El marcaje isotópico con nitrógeno 15 se llevó a cabo cambiando la composición isotópica de la solución nutritiva Hoagland con nitrógeno 15 (<sup>15</sup>N). Simultáneamente al marcaje isotópico con <sup>13</sup>C se procedió a realizar el marcaje con <sup>15</sup>N, el cual consistió en reemplazar el <sup>14</sup>N que formaba parte del nitrato de amonio comercial (<sup>14</sup>NH<sub>4</sub><sup>14</sup>NO<sub>3</sub>) de la solución Hoagland por <sup>15</sup>N (<sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>15</sup>NO<sub>3</sub>) (Cortec Net, France) que está enriquecido en un 5 %. Se regaron las plantas a capacidad de contenedor con la nueva solución enriquecida con <sup>15</sup>N durante los tres días de marcaje.

Las plantas una vez el invernadero, se les realizaron varios lavados con agua destilada para remover el <sup>15</sup>N del sustrato.

### 3.5.2. Medidas isotópicas y análisis elemental (Exp. I y II)

Se realizaron análisis isotópicos en muestras de gases y de la materia orgánica total (MOT) de los tejidos vegetales.

En el caso de los gases, se determinó la composición isotópica del carbono de las siguientes muestras:

- $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  del aire exterior del invernadero.
- $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  del aire de crecimiento en los módulos del invernadero.
- $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  dentro de la cámara CONVIRON (antes y durante el marcaje).
- $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  respirado por los diferentes órganos de la planta en la cámara de metacrilato.

Mientras que en la materia orgánica total se determinó:

- Las composiciones isotópicas de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y de nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) en los diferentes órganos de la planta.
- Los contenidos nitrógeno y carbono de los tejidos.

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

#### 3.5.2.1 Determinación de la composición isotópica de $^{13}\text{C}$ del $\text{CO}_2$ en el aire (Exp. I)

##### 3.5.2.1.1 Obtención de muestra de aire con el $\text{CO}_2$ respirado por las plantas

Para obtener el  $\text{CO}_2$  respirado en oscuridad de los diferentes órganos, las plantas fueron previamente adaptadas durante unos 30-45 minutos en una habitación oscura. Luego, cada uno de los órganos (hojas, raíces y rizomas), se colocaron por separado, dentro de una cámara de metacrilato (Nogués *et al.*, 2004). Las raíces y los rizomas se lavaron previamente y se colocaron dentro de la cámara al momento de realizar la medida.

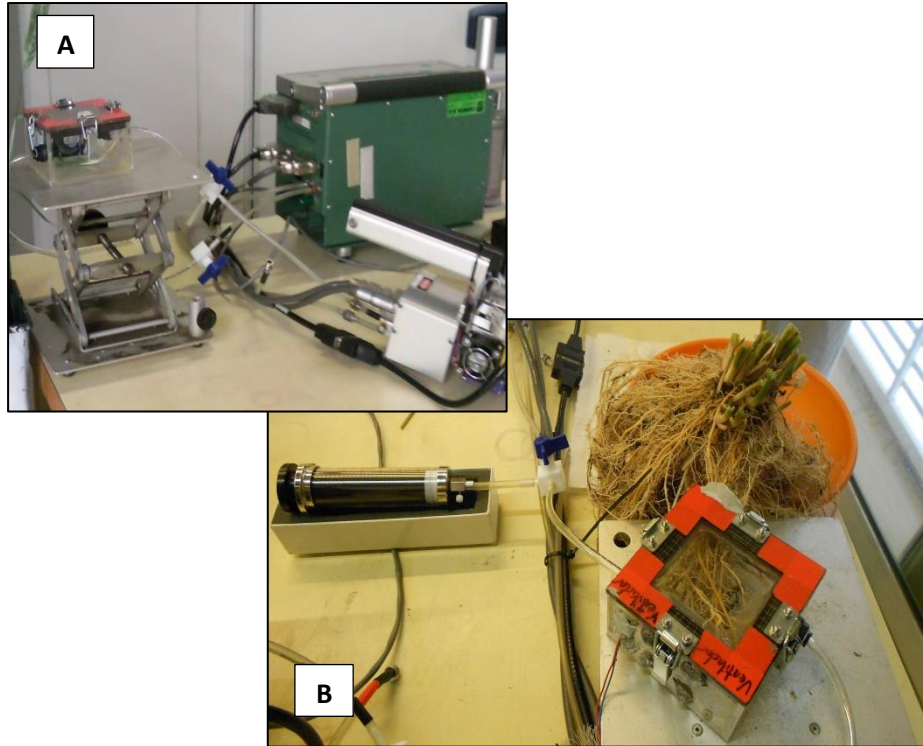
La cámara se conectó en paralelo, entre la consola y la pinza, al sistema de medida LI- 6400 mediante el tubo de aire de muestra (Fig. 3.6 A). El nivel de PPFd dentro de la cámara se mantuvo a  $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , cubriendo la misma con un paño negro.

Con el fin de acumular solamente el  $\text{CO}_2$  respirado por cada órgano, primeramente se hizo circular aire libre de  $\text{CO}_2$  a través de la cámara (manteniendo el circuito abierto) hasta reducir la concentración interior próximo a  $0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ , luego se cerró el sistema (circuito cerrado) y

se dejó acumular el CO<sub>2</sub> producido por la respiración en el interior de la cámara durante unos 10-15 minutos (dependiendo de cada órgano). Cuando la concentración de CO<sub>2</sub> en la cámara llegó a valores entre 600-1000  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  se recogió la muestra de aire con una jeringa conectada al circuito de la cámara (Fig. 3.6 B).



**Figura 3.4.** Procedimiento de marcaje con <sup>13</sup>C. A) Cámara Conviron; B) Botella comercial con CO<sub>2</sub> enriquecido al 99,9% con <sup>13</sup>C; C) Jeringa de 50 ml para inyectar el CO<sub>2</sub> enriquecido y D) Perfusor que dosifica la entrada del CO<sub>2</sub> a la cámara.



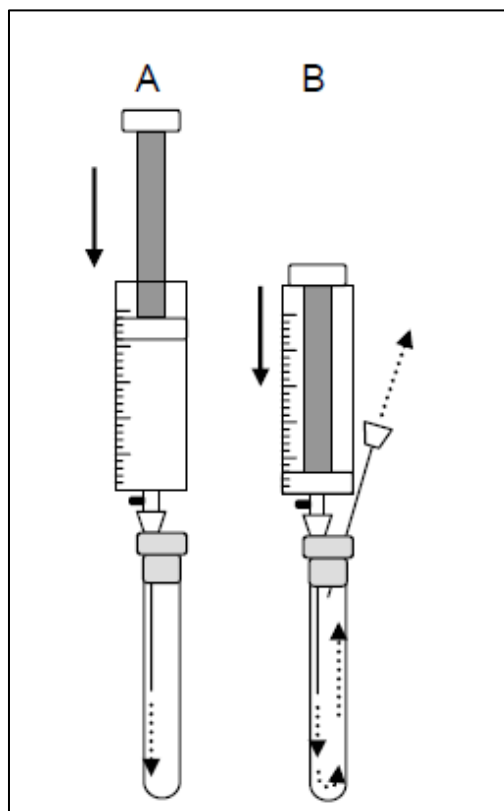
**Figura 3.6.** A) Cámara de metacrilato conectada en paralelo, entre la consola y la pinza, al sistema de medida LI-6400 mediante el tubo de aire de muestra; B) Jeringa conectada al circuito de la cámara que recoge la muestra de aire respirado por cada órgano.

#### 3.5.2.1.2 Análisis de las muestras de aire (Exp. I)

Las muestras de aire fueron recogidas con una jeringa de 50 ml (SGE International Pty Ltd, Australia) (Fig.3.6 B). Cada muestra en la jeringa se trasladó a un tubo contenedor de 10 ml (Vacutainer®, BD, Plymouth, Reino Unido).

El trasvase se hizo de la siguiente manera:

Primero se pincha el vacutainer con una aguja y se inyectan unos 10 ml de aire de la muestra (Fig. 3.7 A), luego con una segunda aguja se perfora el septum del tubo para permitir el reemplazo del aire dentro del tubo previamente. A continuación se procede a inyectar el resto de la jeringa de 50 ml, provocando una circulación de la muestra de aire dentro del vacutainer (Fig. 3.7 B). Antes de finalizar la inyección de los 50 ml se retira rápidamente la aguja de salida de aire. Los vacutainers llenados con las diferentes muestras, se almacenaron en cámara fría a 4°C hasta su análisis.



**Figura 3.7.** A) Primera aguja que inyecta la muestra de gas en el vacutainer; B) Segunda aguja que favorece la circulación y permitir el reemplazo del aire dentro del tubo (Pardo, 2006).

La composición isotópica del CO<sub>2</sub> de las muestras de aire se determinó por cromatografía de gases (GC-C-IRMS) de flujo continuo (Fig. 3.8 B).

El CO<sub>2</sub> de las muestras se purificó y separó con un cromatógrafo de gases (6890N, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas de relación isotópica (Delta Plus, Thermo Finnigan, Bremen, Alemania) a través de un interfase de combustión III (Combustion III, Thermo Finnigan, Bremen, Alemania). La columna de capilaridad del cromatógrafo utilizada fue una GS-GasPro (J & W Scientific Inc., Folsom, CA, EE.UU.) de 30 m de longitud x 0,32 mm, por medio de una jeringa (Hamilton, Reno, NV, USA) se aspiraron 0,6 ml de aire de los vacutainers (Fig. 3.8 A) y se inyectaron 0,3 ml a la columna, eliminado los primeros 0,2 ml. La inyección se realizó en split mode con un flujo de 20 ml min<sup>-1</sup>. La temperatura del puerto de inyección fue de 220 °C y la presión de 7,8 bares. El gas portador fue helio a una velocidad de flujo de 1,4 ml min<sup>-1</sup>.



**Figura 3.8.** A) Vacutainers con muestras de aire y jeringa (Hamilton, Reno, NV, USA) con la cual se aspira 0,6 ml de aire de los tubos; B) GC-C-IRMS: Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry.

### 3.5.2.2. Determinación de la composición isotópica de $^{13}\text{C}$ y $^{15}\text{N}$ en la materia orgánica total (Exp. I y II)

Se analizó la materia orgánica total de los diferentes órganos de la planta (hoja, tallo, raíz y rizomas) y se determinó:

- Las composiciones isotópicas de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y de nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ).
- Los contenidos en tanto por ciento de carbono y nitrógeno.
- La relación C/N.

#### 3.5.2.2.1 Obtención de muestras

Las muestras de hojas, tallo, raíz y rizoma se secaron en estufa a  $60^\circ\text{C}$  durante 72 h. Luego la materia seca fue triturada y homogeneizada en un molino de bolas (Retsch MM301, Haan, Germany) hasta obtener un polvo fino (Fig. 3.9 A). Se pesaron entre 0,8 y 1 mg de submuestras en cápsulas de estaño (SYLAB- Elemental Microanalysis, UK), de 8x5 mm de tamaño, con microbalanza de precisión (Mettler Toledo, España) (Fig. 3.9 B). Las cápsulas una vez cerradas se colocaron en una placa Elisa y se almacenaron en un desecador hasta su posterior análisis.





**Figura 3.9.** A) Molino de bolas (Retsch MM301, Haan, Germany) para triturar la materia seca; B) Microbalanza de precisión (Mettler Toledo, España) donde se pesaron entre 0,8 y 1 mg de materia seca; C) Analizador elemental Flash 1108 (EA1108, Serie 1, Carbo Erba Industramentazione, Milán, Italia) acoplado a un espectrómetro de masas de relación isotópica (IRMS) (Delta C, ThermoFinnigan Mat., Bremen, Alemania).

### 3.5.2.2.2. Análisis de las muestras

El  $\delta^{13}\text{C}$  y el  $\delta^{15}\text{N}$  de la MOT se determinaron mediante un EA- IRMS: Analizador elemental Flash 1108 (EA1108, Serie 1, Carbo Erba Industramentazione, Milán, Italia) acoplado a un espectrómetro de masas de relación isotópica (IRMS) (Delta C, ThermoFinnigan Mat., Bremen, Alemania) (Fig. 3.9 C) que operó en modo de flujo continuo. Las muestras se introducen automáticamente al sistema de análisis mediante un carro giratorio y después se someten a combustión y posterior reducción, se analizó el  $\text{N}_2$  y el  $\text{CO}_2$  puro generados para determinar el contenido de C y N, así como las composiciones isotópicas.

La composición isotópica del carbono se expresa como la desviación relativa ( $\delta^{13}\text{C}$ ) en comparación al estándar internacional V-PDB (Viena Pee Dee Belemnite, en partes por mil (‰)) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\delta^{13}\text{C} = \left( \frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{standard}}} \right) - 1 \quad , \text{ donde } R \text{ es la relación } ^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$$

Los resultados del nitrógeno también son expresados con notación ( $\delta^{15}\text{N}$ ) usando patrones de nitrógeno internacionales secundarios conocidos (IAEA N<sub>1</sub> y IAEA N<sub>2</sub> sulfato de amonio y IAEA NO<sub>3</sub> nitrato potásico) referido al N<sub>2</sub> del aire:

$$\delta^{15}\text{N} = \left( \frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{standard}}} \right) - 1 \quad , \text{ donde } R \text{ es la relación } ^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$$

### 3.5.3. Discriminación del <sup>13</sup>C (Exp. I y II)

La discriminación isotópica de carbono ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) de la materia orgánica total (TOM) fue calculada a partir de la siguiente fórmula (Farquhar *et al.*, 1989):

$$\Delta^{13}\text{C} = \frac{\delta_a - \delta_p}{\delta_p + 1}$$

Donde a y p hacen referencia a la composición isotópica del aire y de la planta respectivamente.

### 3.5.4. Proporción de carbono Nuevo (Exp. I)

El carbono-13 suministrado durante los 3 días de marcaje fue asimilado por las plantas por medio de la fotosíntesis, y una parte de ese carbono incorporado es inmediatamente respirado y otra parte es enviado como fotoasimilado a diferentes partes de la planta u órganos. La proporción de carbono nuevo (% C<sub>nuevo</sub>) en el CO<sub>2</sub> respirado en la oscuridad y en la MOT puede ser calculada utilizando los valores  $\delta^{13}\text{C}$  en T0 y T1.

La proporción de carbono “nuevo” (derivado del marcaje isotópico) en el CO<sub>2</sub> respirado en la oscuridad después de la iluminación y el carbono “nuevo” de la MOT fue calculado según las ecuaciones de Nogués *et al.* (2004):



$$x = 100 * \frac{\delta Y' - \delta Y}{\delta_0 - \Delta Y - \delta Y}$$

Donde  $\delta Y'$  y  $\delta Y$  son la composición isotópica del marcaje y el control, respectivamente;  $\delta_0$  es la composición isotópica del aire exterior y  $\Delta Y$  es la discriminación isotópica de carbono, calculada anteriormente.

### 3.6. ESTUDIO MICROSCÓPICO (Exp. IIIb)

La microscopía óptica permitió realizar un estudio a nivel histológico de la radícula emergida en las plántulas de *Panicum virgatum* L. sometidas a estrés salino y déficit hídrico. Para ello se siguió el protocolo utilizado en la Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión del Centro Científico y Tecnológico de la Universidad de Barcelona (CCiTUB) ubicado en la Facultad de Medicina.

#### 3.6.1. Preparación del material para estudios estructurales

A los 20 días de ensayo, se seleccionaron cuatro plántulas de los tratamientos CINA y PEG a - 0,8 MPa y del control. Para obtener la radícula, se realizó un corte sesgado, con bisturí, en la unión de la semilla con la radícula.

##### 3.6.1.1. Fijación, deshidratación e inclusión

Procedimiento:

1. La fijación de las radículas se efectuó en glutaraldehído 2,5 % + paraformaldehído 2 % en tampón de fosfato sódico (PB) 0,1 M y pH 7,4 durante 24-48 h y a 4° C. Se sometió a suave vacío durante las primeras horas para facilitar la infiltración. Después de varios lavados (4 x 10 min, 4 °C) con PB 0,1 M (pH 7,4), las muestras fueron post-fijadas (12-16 h, 4 °C) en tetraóxido de osmio 1 % y ferrocianuro potásico 0,8 % en el mismo tampón.
2. A continuación, las muestras se lavaron 4 x 10 minutos (cada lavado) con agua destilada y se deshidrataron mediante pasos sucesivos (30 min. cada uno) por inmersión

en soluciones de acetona de concentraciones crecientes a temperatura ambiente (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2.** Series de deshidratación con acetona como solvente durante los siguientes tiempos.

| % SOLVENTE | TIEMPO    | TEMPERATURA |
|------------|-----------|-------------|
| 25         | 1x10 min. | 4°C         |
| 50         | 1x10 min. | 4°C         |
| 70         | 2x10 min. | 4°C         |
| 90         | 3x10 min. | 4°C         |
| 96         | 3x10 min. | 4°C         |
| 100        | 3x15 min. | 4°C         |

3. La inclusión se realizó con Spurr (1969), que es una resina epoxy de baja viscosidad. Las muestras se infiltraron en mezclas de resina: acetona 100 % (v/v) en diferentes proporciones (Tabla 3.3), se realizó en agitación y a temperatura ambiente. Tras la infiltración se procedió a la obtención de bloques (cuatro por cada muestra). La polimerización de la resina se realizó a 60 °C, 48 h.

**Tabla 3.3.** Pasos a seguir para la infiltración de las muestras incluidas en resina.

| PROPORCIÓN ACETONA/SPURR | TIEMPO DE INFILTRACIÓN |
|--------------------------|------------------------|
| 1:3                      | Toda la noche          |
| 2:2                      | 7 horas                |
| 3:1                      | Toda la noche          |
| spurr puro               | 72 horas               |
| spurr puro               | 72 horas               |

### 3.6.1.2. Obtención de cortes

Se obtuvieron pirámides de bloques en un piramitomo (TM60, Reichert). Los cortes semifinos de 1 µm de grosor se obtuvieron mediante un ultramicrotomo Ultracut E. de Leica, y a una distancia de 25 µm del ápice radicular.

### 3.6.1.3. Tinción y contrastado

Los cortes semifinos se recogieron (en medio acuoso) sobre portaobjetos, se adhirieron a los mismos por calor (placa calefactora a 90 °C) y se tiñeron con azul de metileno 1 % (30-40”), después de un lavado abundante con H<sub>2</sub>O-milliQ, se dejaron secar por calor y se montaron en resina sintética no hidrosoluble (DPX).

### 3.6.1.4. Observación y parámetros medidos

Las secciones semifinas se observaron en un microscopio óptico Olympus (CX41). Las imágenes se captaron con una cámara Olympus DP70 conectada a un ordenador, las imágenes se analizaron con el programa Image J (Image Processing and Analysis in Java) y se midieron los siguientes parámetros:

- Área de la sección transversal de la radícula ( $\mu\text{m}^2$ )
- Número de capas de células de la corteza
- Grosor de la pared interna de la endodermis ( $\mu\text{m}$ )

## **3.7. ANALISIS ESTADISTICO**

Las medias y errores estándar (SE) para cada parámetro medido se representaron gráficamente con el programa SigmaPlot 10.0 y se sometieron a test estadísticos con el software estadístico SSPP 20.0 (SSPP Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

### **3.7.1. Experimento I y II**

El análisis de los datos se realizó mediante (ANOVA), las variables dependientes fueron verificadas por la normalidad y homocedasticidad. Cuando una prueba en particular fue significativa se compararon las medias mediante una prueba de comparación múltiple de Duncan. Las diferencias se consideraron significativas a un nivel de probabilidad  $P \leq 0,05$ .

### 3.7.2. Experimento III

Para el análisis de los datos de PG % final se realizó una ANOVA (ídem 3.7.1), mientras que para evaluar la velocidad de germinación y la relación entre PG % y velocidad de germinación se realizó un Análisis de Supervivencia.

El análisis de supervivencia es una herramienta muy usada en la investigación clínica y epidemiológica. En este campo, es muy común que la variable que se desea estudiar sea el tiempo que tarda en ocurrir un suceso, el cual puede ser beneficioso (curación, alta hospitalaria, etc.) o perjudicial (muerte, aparición de efecto adverso, rechazo del trasplante, etc.) o incluso indiferente (cambio de tratamiento). Se trata de un análisis no paramétrico que estudia el tiempo hasta que ocurre un suceso, en nuestro caso el suceso, fue del tipo beneficioso y, es el tiempo en que una semilla tarda en germinar. La característica más importante de este tipo de datos (tiempo hasta que ocurre un suceso) es que, muy probablemente, al final del periodo de observación no todos los individuos (las semillas) habrán presentado el suceso objeto de estudio (germinación).

El objetivo del análisis de supervivencia es el análisis y la predicción de tiempos de duración de una determinada situación, que termina con la ocurrencia de un evento. Para ello, se estudia el tiempo que transcurre entre un momento inicial (siembra) y la ocurrencia de un evento (germinación). Todos los individuos que hasta el último momento en que fueron observados (bien sea al final del estudio o antes, o si se perdieron por alguna causa) y no hayan desarrollado el suceso, tienen también importancia, y el tiempo durante el que fueron observados debe intervenir en el análisis (Kleinbaum y Klein, 2012).

Dentro del análisis de supervivencia se destaca el método de Kaplan–Meier (Kaplan y Meier, 1958), en el cual se utilizan todas las observaciones. Este método nos permite evaluar, de modo individual, los posibles factores pronóstico, calcular la supervivencia cada vez que un sujeto presenta el evento y, al igual que otros métodos univariantes, nos permite comparar dos o más curvas de supervivencia a lo largo del tiempo. También nos aporta los valores de la media y mediana e incluso los cuartiles (PG50 y PG75 %, en nuestro caso). Cuando se desea contrastar dos o más curvas de supervivencia, es decir la función de cada tratamiento, existen test no paramétricos. Nosotros hemos empleado el test de Log-Rank, que es un contraste de hipótesis que compara las curvas de supervivencia, se pueden comparar dos o más de dos, y usa como estadístico una "Chi cuadrado" (Fernández et al., 1996). En nuestro experimento cuando el P-valor fue menor a 0,05 consideramos que hubo diferencias significativas entre tratamientos.

En los estudios clínicos de supervivencia una vez se hayan estudiado los factores pronóstico de modo individual, se han de estudiar éstos en su conjunto (para poder evaluar las posibles interacciones) mediante análisis multivariado. La regresión de Cox es un análisis de supervivencia multivariado la cual se basa en el supuesto de riesgos proporcionales, es decir, se presupone que los riesgos de los factores son proporcionales a lo largo del tiempo. Hay diferentes métodos de verificación de este supuesto, algunos autores se basan en observar las curvas de supervivencia dadas por Kaplan-Meier y ver si éstas son paralelas (Fernández et al., 1996). Para nuestro caso, el riesgo es una medida que tiene en cuenta la probabilidad de que la semilla haya llegado a un día determinado sin germinar y la probabilidad de que germine en ese día. La función de riesgo nos sirve para englobar el porcentaje de germinación total y la velocidad de germinación en un mismo parámetro y para contrastar si existen diferencias entre tratamientos respecto el control. Esto nos da una idea del comportamiento de la germinación durante todo el período de ensayo de un tratamiento respecto al control, y por lo tanto, la calidad de germinación (alto PG en el menor tiempo posible) de cada tratamiento respecto al control.

## 4. *Resultados*



## 4.1. EXPERIMENTO I: CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS TRES ESPECIES EN AMBIENTE CONTROLADO

### 4.1.1. Medidas de crecimiento

#### 4.1.1.1. Altura del tallo y producción de materia seca

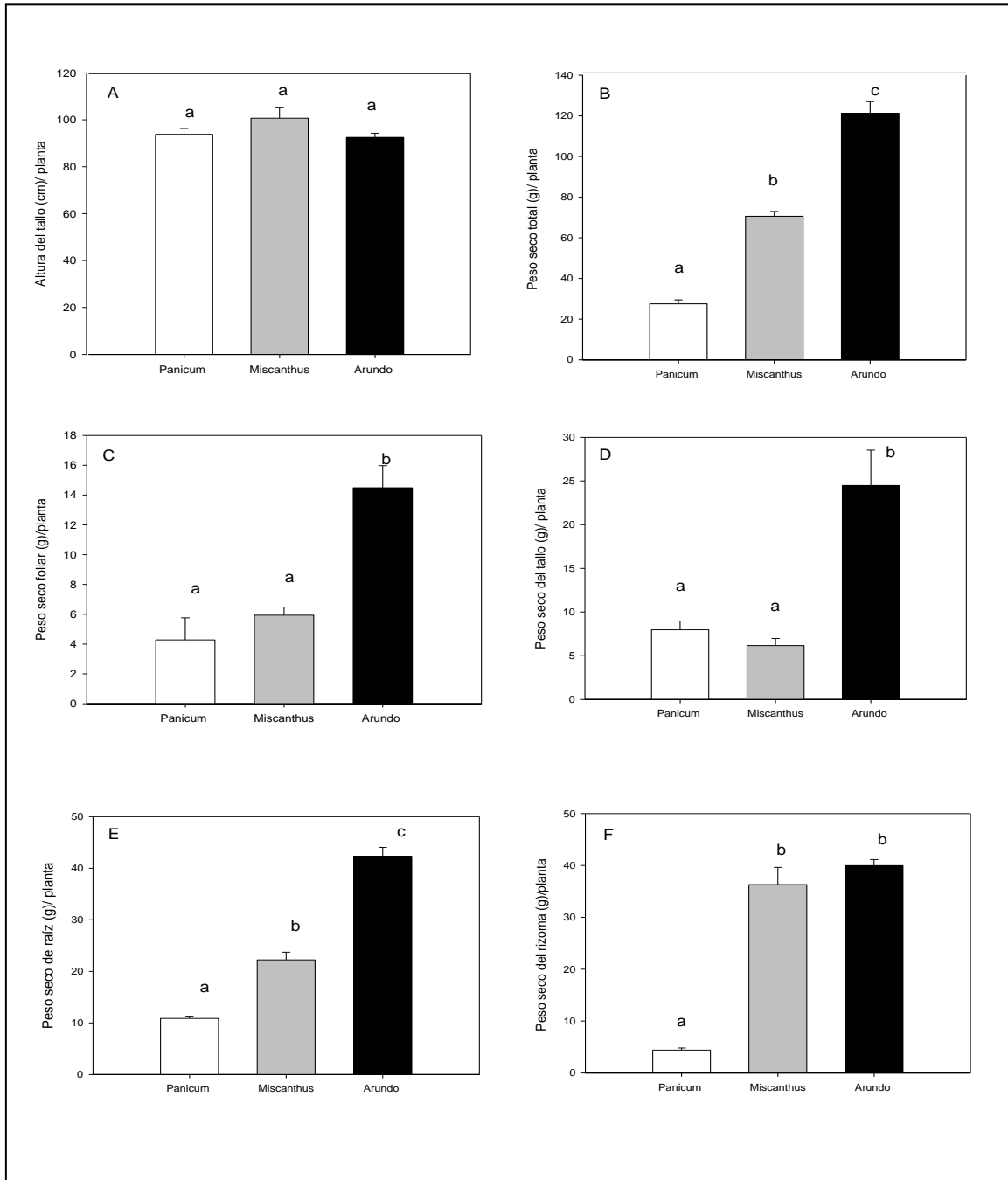
Las plantas estuvieron creciendo durante 6 meses en invernadero bajo condiciones óptimas. Al finalizar el experimento, las tres especies alcanzaron la misma altura no observándose diferencias significativas entre ellas (Fig. 4.1.1 A). Si encontramos diferencias en el resto de los parámetros medidos como peso seco, la especie que presentó mayor PS Total por planta (g) fue la caña común ( $121,29 \pm 5,73$ ) en comparación con miscantus y switchgrass que pesaron, un 42% y un 77%, menos respecto al PS de la caña común (Fig.4.1.1 B). No hubo diferencias significativas en el PS de hojas y tallos entre las plantas C4 (switchgrass y miscantus), pero sí éste fue mucho menor comparado con la especie C3 (caña común) (Fig. 4.1.1 C y D). En general, las tres especies presentaron mayor peso seco en la parte subterránea (raíz + rizoma) comparado con la parte aérea (hojas + tallos). A nivel radicular hubo diferencias significativas entre las 3 especies, siendo la caña común la que presentó mayor PS. No hubo diferencias significativas en el PS de rizoma entre la caña común y miscantus, quienes presentaron un mayor peso comparado con switchgrass (Fig. 4.1.1 E y F).

#### 4.1.1.2. Área Foliar y cocientes entre fracciones

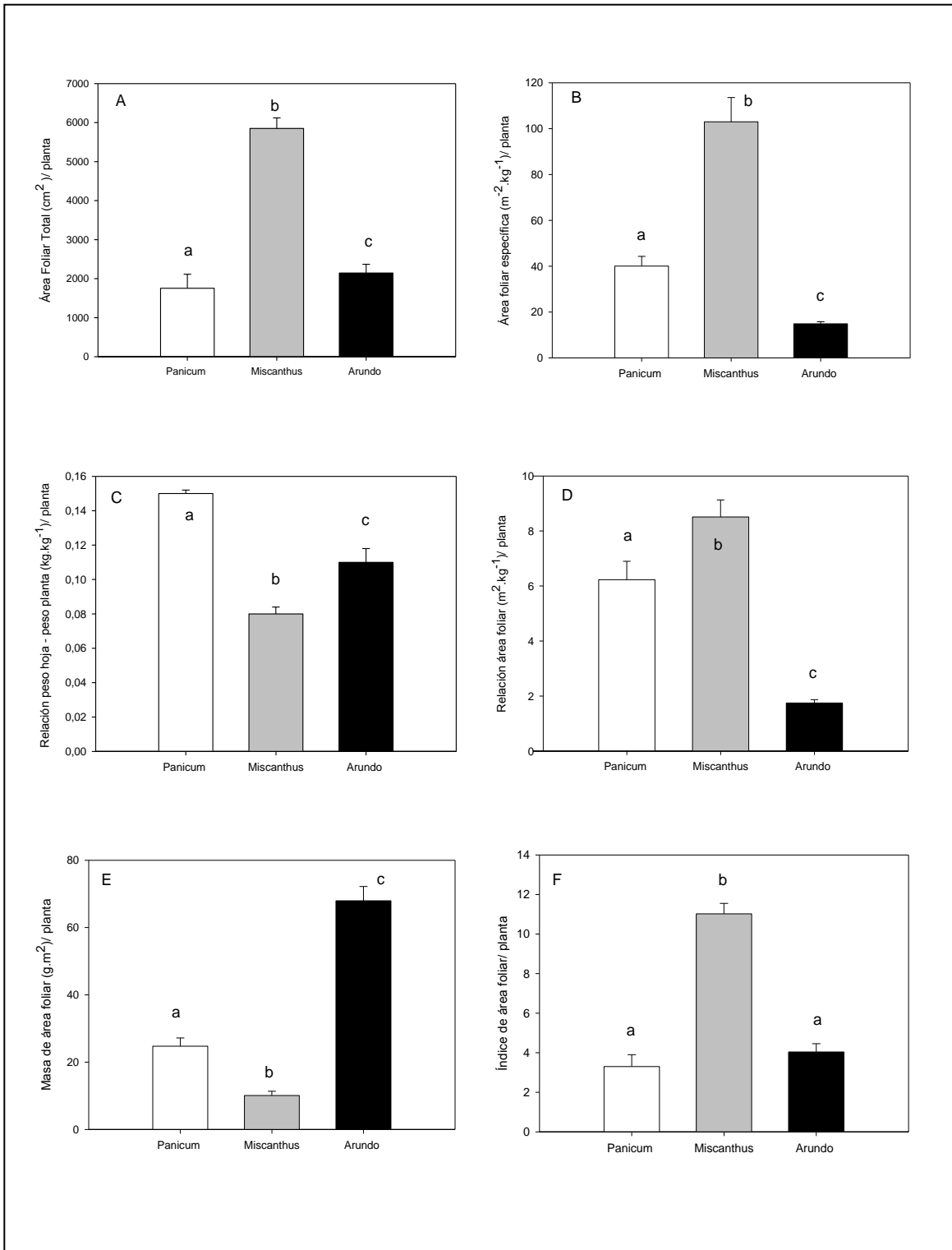
Miscantus fue la especie con mayor área foliar ( $\text{cm}^2$ ) por planta en comparación con switchgrass y la caña común, y no hubo diferencias entre estas dos últimas especies (Fig. 4.1.2 A). El valor del área foliar específica ( $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$ ) por planta también fue mayor en miscantus ( $102,98 \pm 10,56$ ) seguido de switchgrass ( $40,03 \pm 4,27$ ); y el valor más bajo fue para la caña común ( $14,87 \pm 0,89$ ) (Fig. 4.1.2 B). Los valores de cociente entre el peso seco de las hojas con respecto al peso seco de la planta entera ( $\text{kg kg}^{-1}$ ) fueron muy bajos y significativos para las tres especies, siendo el switchgrass el que presentó mayor valor ( $0,15 \pm 0,01$ ), seguido por caña común ( $0,11 \pm 0,008$ ) y luego miscantus ( $0,08 \pm 0,004$ ) (Fig. 4.1.2 C). También, hubo diferencias significativas para las tres especies en los valores del cociente área foliar ( $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$ ) y masa del área foliar ( $\text{g m}^2$ ) por planta, donde miscantus tuvo el valor más alto ( $8,51 \pm 0,62$ ) de relación área foliar ( $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$ ) seguido de switchgrass ( $6,23 \pm 0,67$ ) y la caña común presentó el valor más bajo ( $1,75 \pm 0,12$ )



(Fig. 4.1.2 D). Mientras que para la masa del área foliar ( $\text{g m}^{-2}$ ), la caña común tuvo el mayor valor ( $67,98 \pm 4,22$ ) seguido de switchgrass ( $25,75 \pm 2,44$ ) y miscantus ( $10,10 \pm 1,27$ ). El índice de área foliar fue mayor en miscantus comparado con switchgrass y caña común y no hubo diferencias significativas entre estas dos últimas especies (Fig. 4.1.2 E).

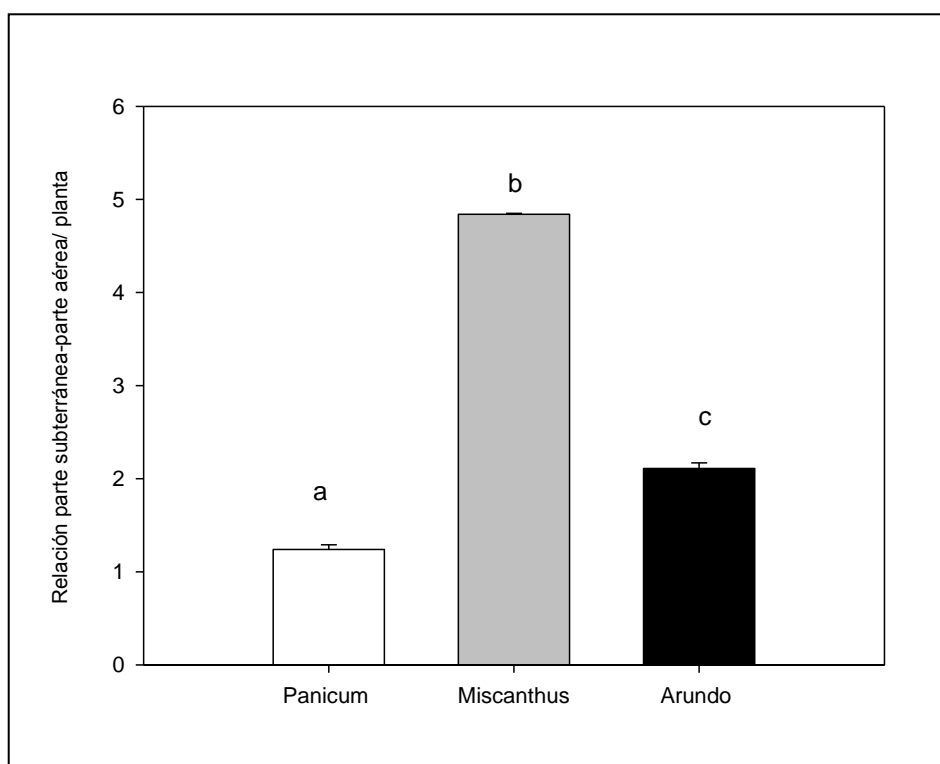


**Figura 4.1.1.** Parámetros de crecimiento medidos en plantas de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L., crecidas en invernadero bajo condiciones óptimas. A) Altura (cm)/ planta; B) PS Total (g)/ planta; C) PS de la hoja (g)/ planta; D) PS del tallo (g)/ planta; E) PS de raíz (g)/ planta; F) PS del rizoma (g)/ planta. Los valores representan la media  $\pm$  SE de cuatro réplicas ( $n=4$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre especies.



**Figura 4.1.2.** Área foliar total y cocientes entre fracciones medidos en plantas de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L., crecidas en invernadero bajo condiciones óptimas. A) Área foliar total (cm<sup>2</sup>) / planta; B) Área foliar específica (m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup>) / planta; C) Cociente peso-hoja/pes-planta (kg kg<sup>-1</sup>) / planta; D) Cociente área de la hoja (m<sup>2</sup> kg) / planta; E) Masa de área foliar (g m<sup>-1</sup>) / planta y F) Índice de área foliar / planta. Los valores son la media ± SE de cuatro réplicas (n=4). Letras diferentes indican diferencias significativas (P < 0,05) entre especies.

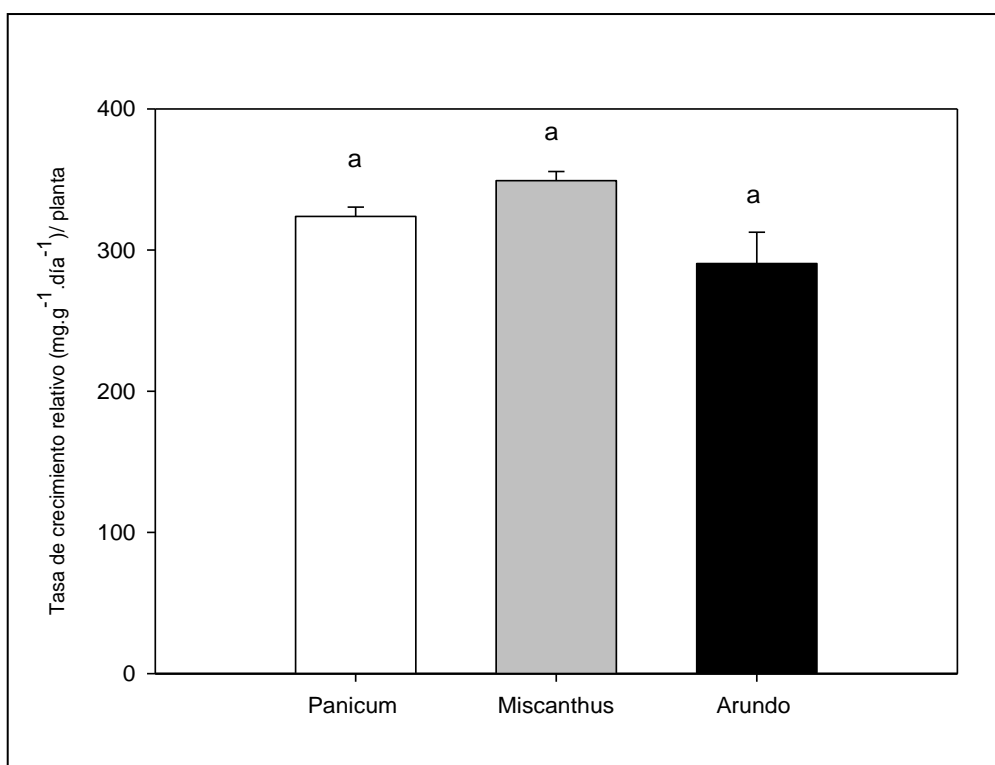
Para relacionar la parte subterránea (raíz + rizoma) con la parte aérea (hojas + tallos) usamos el cociente ( $R/S$ ) "Root/Shoot". Las tres especies mostraron diferencias significativas. Miscanthus mostró el mayor valor de  $R/S$ , donde el 82,86% de su peso seco fue destinado a la parte subterránea y el 17% a la parte aérea. Seguido por la caña común, que distribuyó un 67% a la parte subterránea y un 32% a la canopia. Por último, la fracción  $R/S$  en switchgrass dio un valor cercano a 1, es decir tuvo una distribución más balanceada, donde un 55,49 % del peso seco se destinó para la parte subterránea y un 44% para la parte aérea (Fig. 4.1.3).



**Figura 4.1.3.** Relación Parte subterránea/ parte aérea ( $R/S$ )/ planta en *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en invernadero bajo condiciones óptimas. Los valores son la media  $\pm$  SE de cuatro réplicas ( $n=4$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre especies.

#### 4.1.1.3. Tasa de Crecimiento Relativo (TCR)

Las tres especies mostraron altas tasas de crecimiento relativa (TCR) y no hubo diferencias significativas entre ellas, obteniendo valores entre 300-350 ( $\text{mg g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) de ganancia de peso por unidad de biomasa y tiempo (Fig. 4.1.4).



**Figura 4.1.4.** Tasa de crecimiento relativo (TCR) ( $\text{mg g}^{-1} \text{día}^{-1}$ ) / planta medido en plantas de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en invernadero bajo condiciones óptimas. Los valores son la media  $\pm$ SE de cuatro réplicas ( $n=4$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre especies.

## 4.1.2. Medidas fisiológicas

### 4.1.2.1. Medidas de intercambio de gases foliar

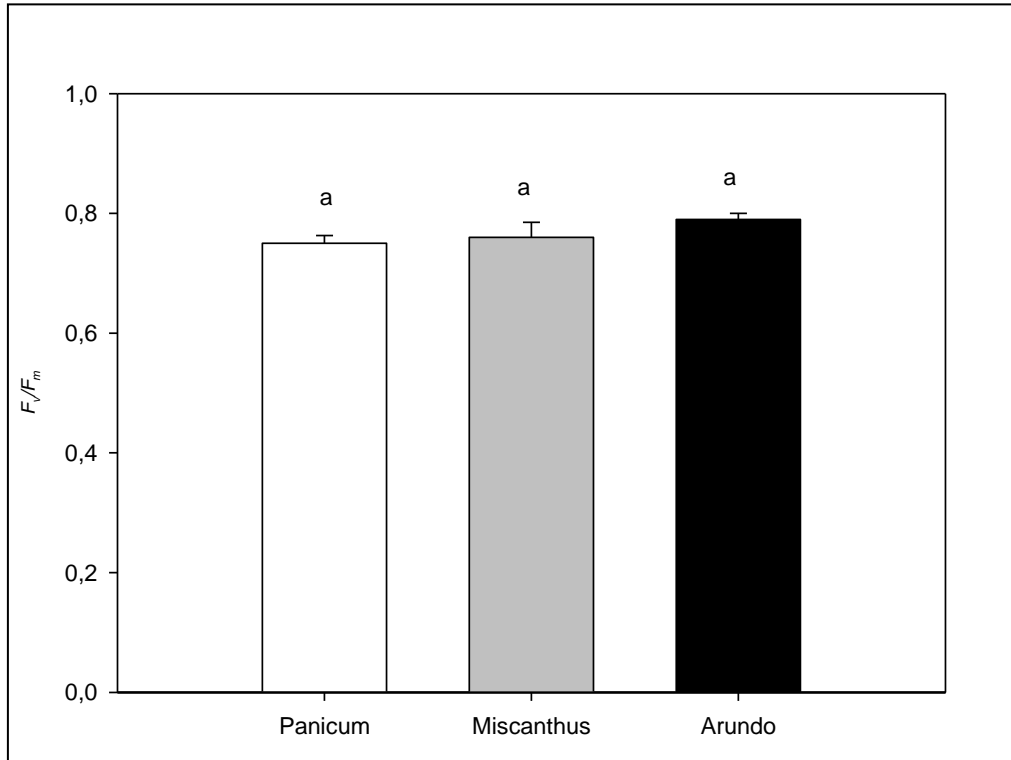
Las curvas  $A/c_i$  permitieron el cálculo de diferentes parámetros fotosintéticos, como  $A_{sat}$ ,  $A_{max}$ ,  $V_{c, max}$ , y  $J_{max}$ . La tabla 4.1.1 muestra los resultados obtenidos para las tres especies al final del experimento. En general, podemos observar que la especie C3 “caña común” obtuvo valores significativos en comparación con las otras dos especies C4 para la mayoría de los parámetros medidos.. La caña común fue la especie que presentó mayores valores de tasa de fotosíntesis neta a saturación de luz ( $A_{sat}$ ), tasa de fotosíntesis neta máxima a saturación de  $\text{CO}_2$  y luz ( $A_{max}$ ), conductancia estomática ( $g_s$ ), valores de velocidad de carboxilación ( $V_{c, max}$ ) y de tasa de transporte de electrones ( $J_{max}$ ) que contribuye a la regeneración enzimática, comparado con switchgrass y miscanthus; y a su vez no se encontraron diferencias significativas entre las especies C4.

**Tabla 4.1.1.** Parámetros fotosintéticos medidos en plantas de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones controladas. Tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub> a saturación de luz ( $A_{sat}$ ), tasa de fotosíntesis neta máxima ( $A_{max}$ ), conductancia estomática ( $g_s$ ), velocidad de carboxilación de la Rubisco ( $V_{c,max}$ ) y tasa de transporte de electrones ( $J_{max}$ ). Los valores representan la media  $\pm$  SE de tres repeticiones ( $n = 3$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las especies.

| Parámetros   | Especies                   |                               |                        |
|--|----------------------------|-------------------------------|------------------------|
|  | <i>Panicum virgatum</i> L. | <i>Miscanthus x giganteus</i> | <i>Arundo donax</i> L. |
| $A_{sat}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )   | 22,43 $\pm$ 0,52a          | 23,00 $\pm$ 0,58a             | 27,17 $\pm$ 0,44b      |
| $A_{max}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )   | 25,63 $\pm$ 0,52a          | 27,57 $\pm$ 1,34a             | 35,03 $\pm$ 1,57b      |
| $g_s$ (mol H <sub>2</sub> O $\text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )      | 0,13 $\pm$ 0,02a           | 0,15 $\pm$ 0,02a              | 0,36 $\pm$ 0,03b       |
| $V_{c,max}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) | 69,8 $\pm$ 7,60a           | 69,3 $\pm$ 2,03a              | 131,55 $\pm$ 44,19b    |
| $J_{max}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )   | 125,4 $\pm$ 5,60b          | 90,7 $\pm$ 8,56a              | 227,84 $\pm$ 15,33c    |

#### 4.1.2.2. Medidas de la fluorescencia modulada de las clorofilas

Se obtuvieron valores de rendimiento cuántico máximo del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ), medidos en la oscuridad, cercanos a 0,7 en las C4 y 0,8 en la especie C3, pero esta diferencia entre las especies no fue significativa (Fig. 4.1.5). La curva de respuesta de la fotosíntesis a luz absorbida ( $A/PAR$ ) (Fig. 4.1.6 A), muestra un aumento en la tasa de fotosíntesis neta a medida que se incrementa la cantidad de la luz hasta niveles de luz de 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Las tres especies se comportaron de manera similar no mostrando diferencias significativas entre ellas. La eficiencia cuántica relativa del transporte de electrones del fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ), la eficiencia de la captura de la energía de excitación por los centros de reacción abiertos del fotosistema II ( $F_v'/F_m'$ ) y los valores de quenching fotoquímico ( $qP$ ) disminuyeron a medida que se aumentaron los niveles de luz (Fig. 4.1.6 B, C y D), no observándose diferencias significativas entre C3 y C4 en los parámetros  $\Phi_{PSII}$  y  $qP$ . El valor  $F_v'/F_m'$  en la caña común disminuyó a medida que aumentó el nivel de luz pero fue menor la disminución comparado con las especies C4.



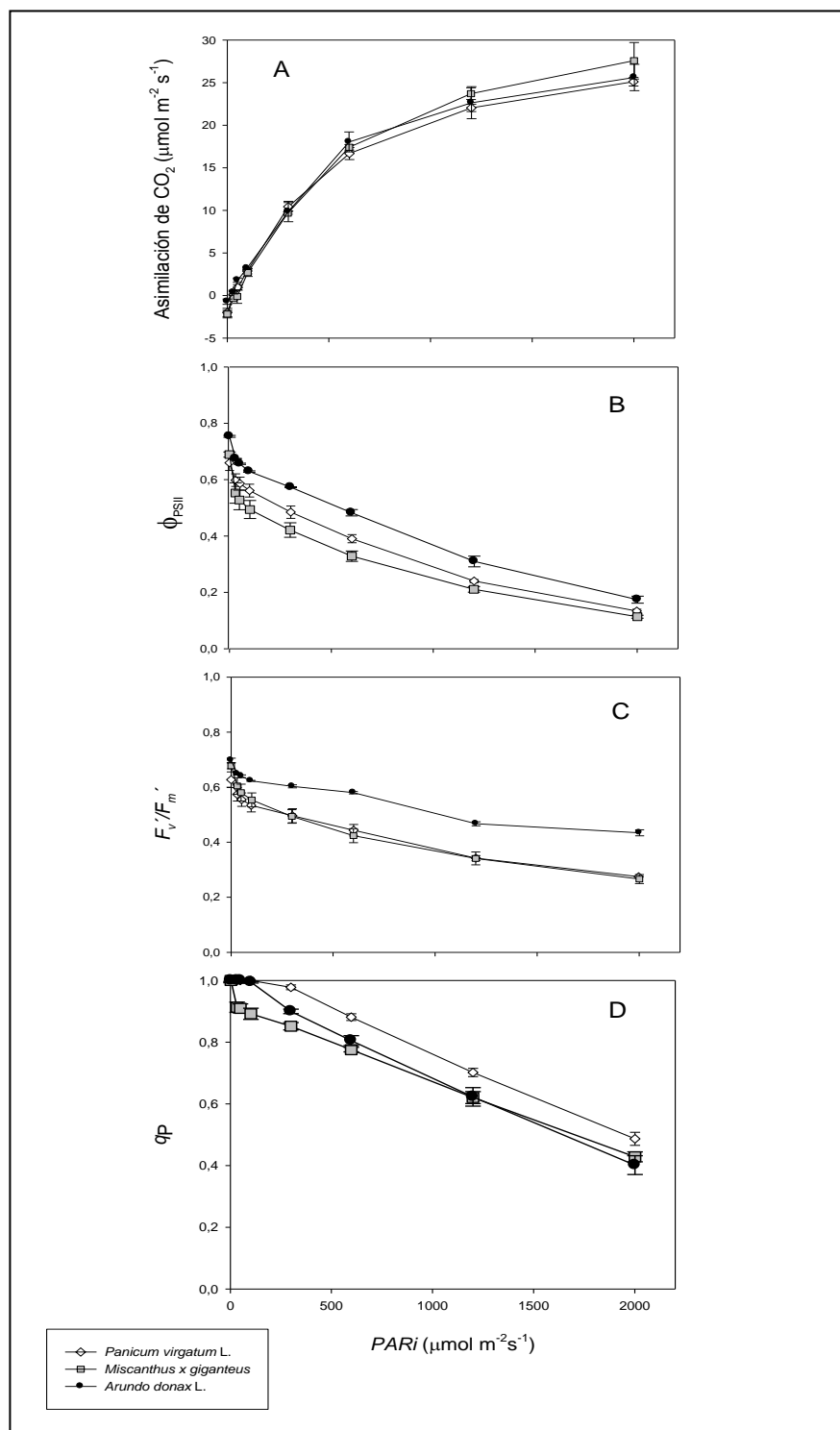
**Figura 4.1.5.** Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ), medido en la oscuridad, en plantas de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones controladas. Los valores son las medias  $\pm$  SE de tres repeticiones ( $n = 3$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las especies.

#### 4.1.2.3. Eficiencia del Uso del Agua

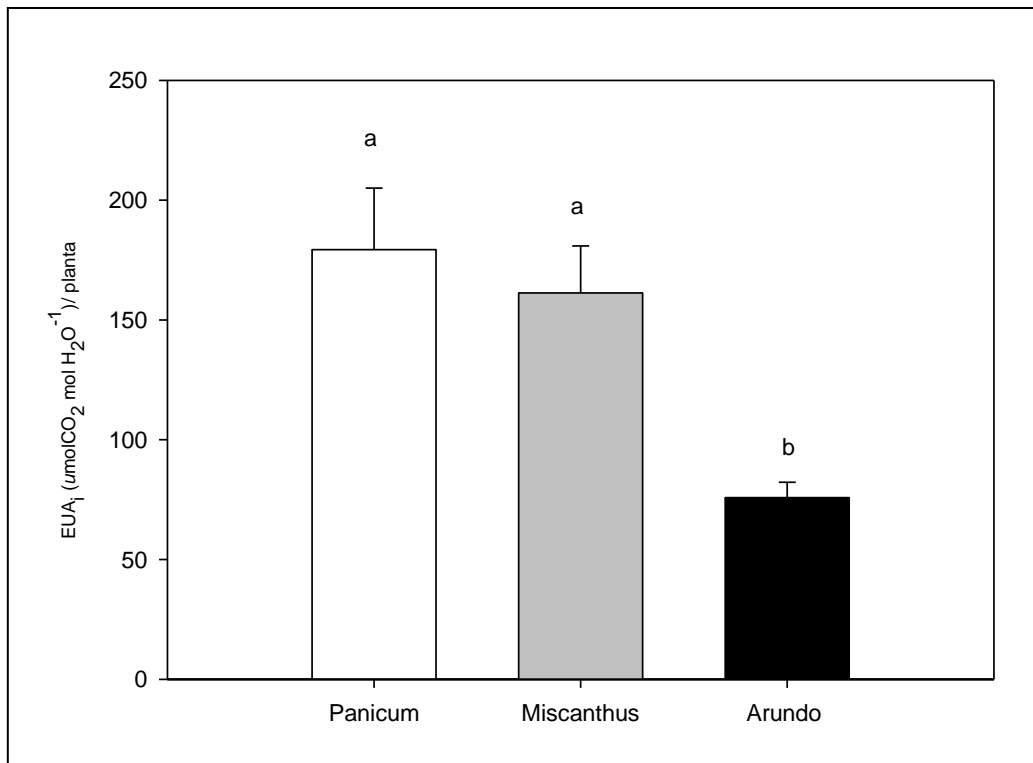
A partir de los datos obtenidos de  $A_{sat}$  y  $g_s$  calculamos la eficiencia del uso del agua intrínseca  $EUA_{intrínseca}$  ( $\mu\text{molCO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ ) / planta. Los resultados indican que las especies C4 tuvieron mayor  $EUA_{intrínseca}$  comparada con la especie C3 y, a su vez, no se observaron diferencias significativas entre switchgrass y miscanthus (Fig. 4.1.7).

#### 4.1.2.4. Eficiencia de Uso del Nitrógeno

Una vez que las plantas fueron cosechadas, se cuantificó el contenido de nitrógeno, se calculó la eficiencia de uso del nitrógeno/planta como el cociente entre el peso seco de la biomasa total (g) y nitrógeno total en la biomasa (g). En la tabla 4.1.2 podemos observar que las especies C4 tuvieron una mayor EUN comparado con la caña común.



**Figura 4.1.6.** Parámetros de fluorescencia medidos en plantas de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L., crecidas en condiciones controladas. A) Curva de respuesta de la fotosíntesis a luz absorbida ( $A/PAR_i$ ), B) Eficiencia cuántica relativa del transporte de electrones del fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ), C) Eficiencia de la captura de la energía de excitación por los centros de reacción abiertos del fotosistema II ( $F_v'/F_m'$ ) y D) Quenching fotoquímico ( $qP$ ). Los valores son las medias  $\pm$  SE de tres repeticiones ( $n = 3$ ). El análisis estadístico se muestra en la tabla S1 del apartado Anexos.



**Figura 4.1.7.** Eficiencia del Uso del Agua intrínseca ( $\mu\text{molCO}_2 \text{ molH}_2\text{O}^{-1}$ ) / planta en *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones controladas. Los valores son las medias  $\pm$  SE de tres repeticiones ( $n = 3$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las especies.

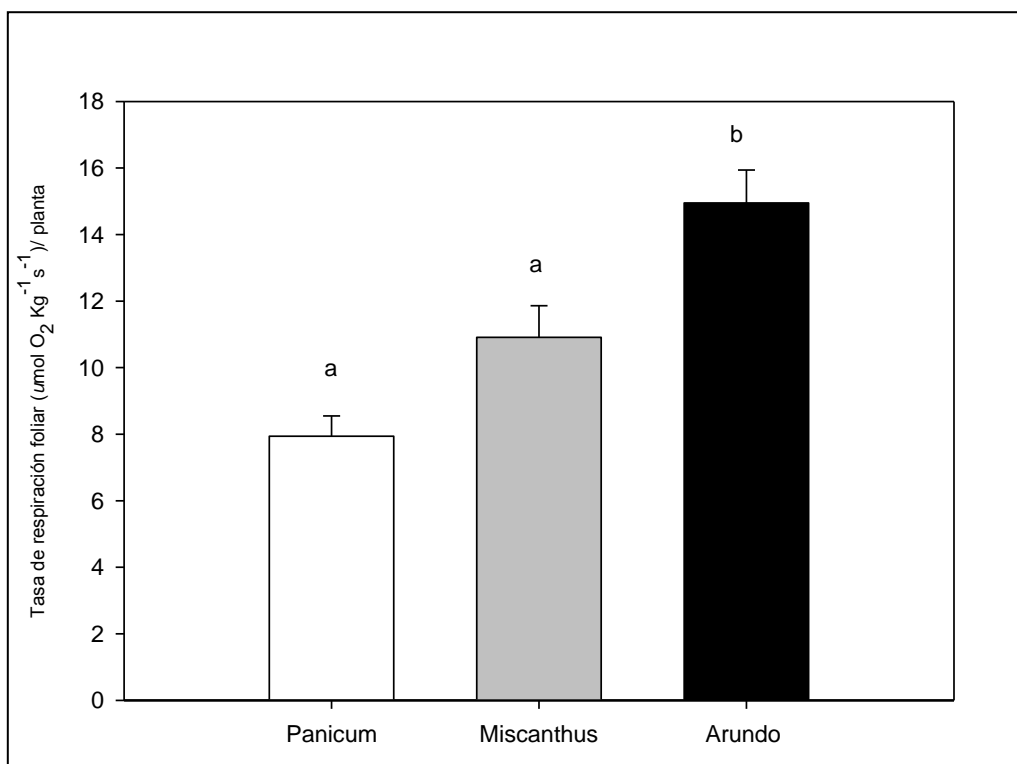
**Tabla 4.1.2.** Eficiencia del Uso del Nitrógeno (gr PS/ g N) / planta en *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones controladas. Los valores son las medias  $\pm$  SE de cuatro repeticiones ( $n = 4$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las especies.

| Parámetros                 | Especies                   |                               |                        |
|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|
|                            | <i>Panicum virgatum</i> L. | <i>Miscanthus x giganteus</i> | <i>Arundo donax</i> L. |
| Peso seco total (g)        | 27,55 $\pm$ 1,95 a         | 70,63 $\pm$ 3,35 b            | 121,29 $\pm$ 5,73 c    |
| Contenido de Nitrógeno (%) | 2,76 $\pm$ 0,24 a          | 2,06 $\pm$ 0,11 b             | 4,14 $\pm$ 0,89 c      |
| EUN (g PS/ g N)            | 36,28 $\pm$ 2,87 a         | 46,53 $\pm$ 0,39 c            | 24,13 $\pm$ 0,36 b     |



#### 4.1.2.5. Tasa de respiración foliar por consumo de O<sub>2</sub>

La tasa de respiración en la oscuridad, medido con el Electrodo de Clark, fue significativamente mayor en la planta C3 comparado con las especies C4 y a su vez, no hubo diferencias significativas entre switchgrass y miscantus (Fig. 4.1.8).



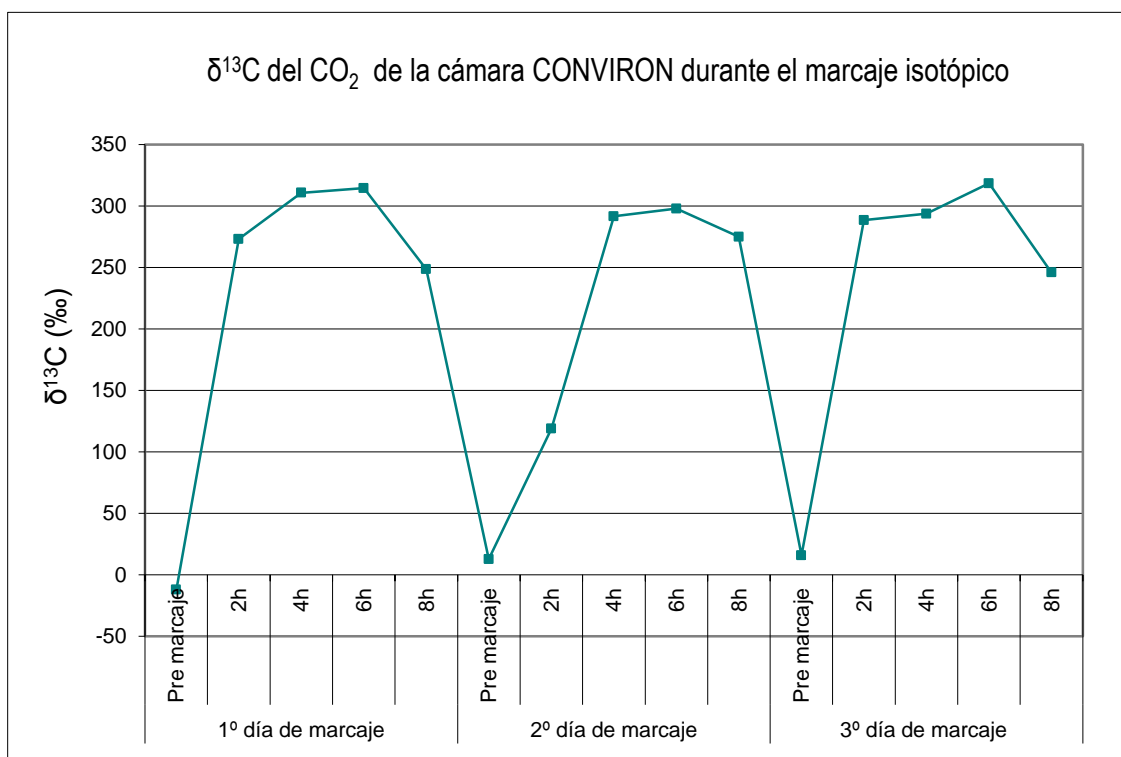
**Figura 4.1.8.** Tasa de respiración foliar ( $\mu\text{molO}_2 \text{Kg}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) / planta medidos con Electrodo de Clark, en hojas de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones controladas. Los valores son las medias  $\pm$  SE de tres repeticiones ( $n = 3$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las especies.

### 4.1.3. Análisis isotópico

#### 4.1.3.1 Composición isotópica del <sup>13</sup>C ( $\delta^{13}\text{C}$ ) en el CO<sub>2</sub> respirado en oscuridad

Durante los 6 meses de crecimiento, las plantas estuvieron en el invernadero del SCE donde el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  del CO<sub>2</sub> del aire fue de  $-11,46 \text{‰} \pm 0,35$ . Para realizar el marcaje isotópico las plantas se colocaron en una cámara de ambiente controlado (CONVIRON) y se dejaron durante una semana para su aclimatación, el  $\delta^{13}\text{C}$  del CO<sub>2</sub> del aire dentro de la cámara durante este período, previo al marcaje, fue de  $-12,5 \text{‰} \pm 0,72$ . Al momento del marcaje, el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  de CO<sub>2</sub> del aire dentro de la cámara fue modificado utilizando CO<sub>2</sub> comercial enriquecido en un

99% con  $^{13}\text{C}$ , de modo el  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  en el aire de la cámara durante los 3 días de marcaje fue de  $273,32 \text{‰} \pm 12,90$  (Fig. 4.1.9).



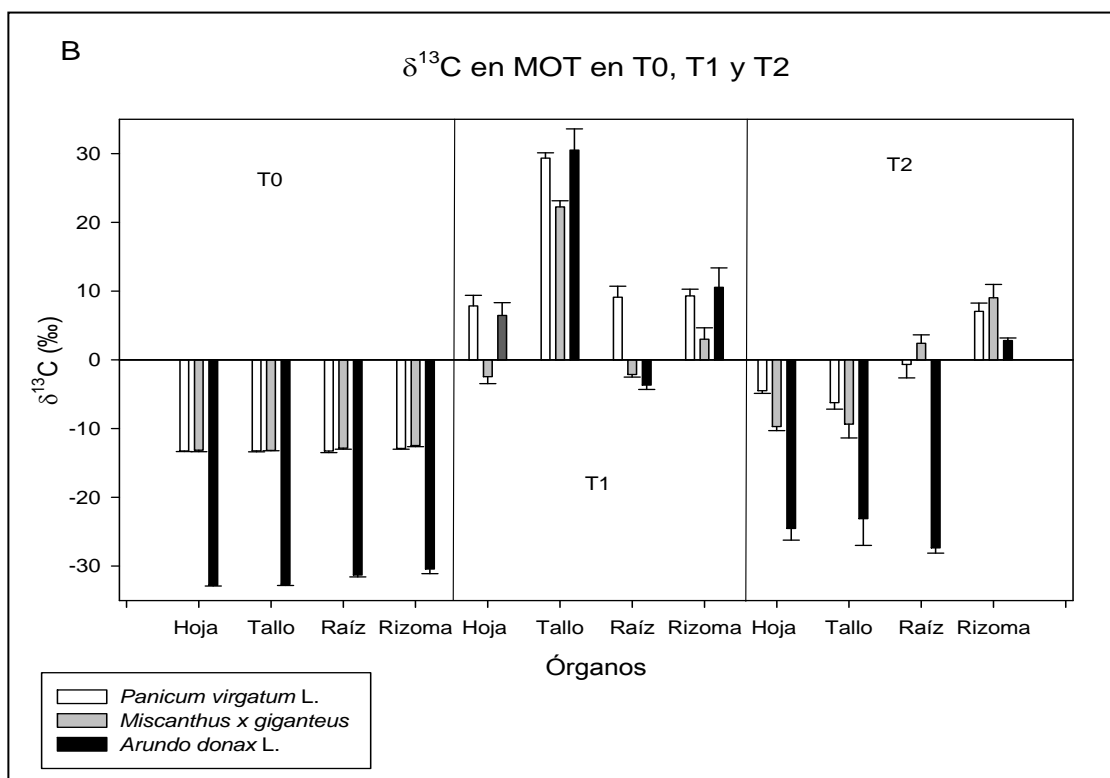
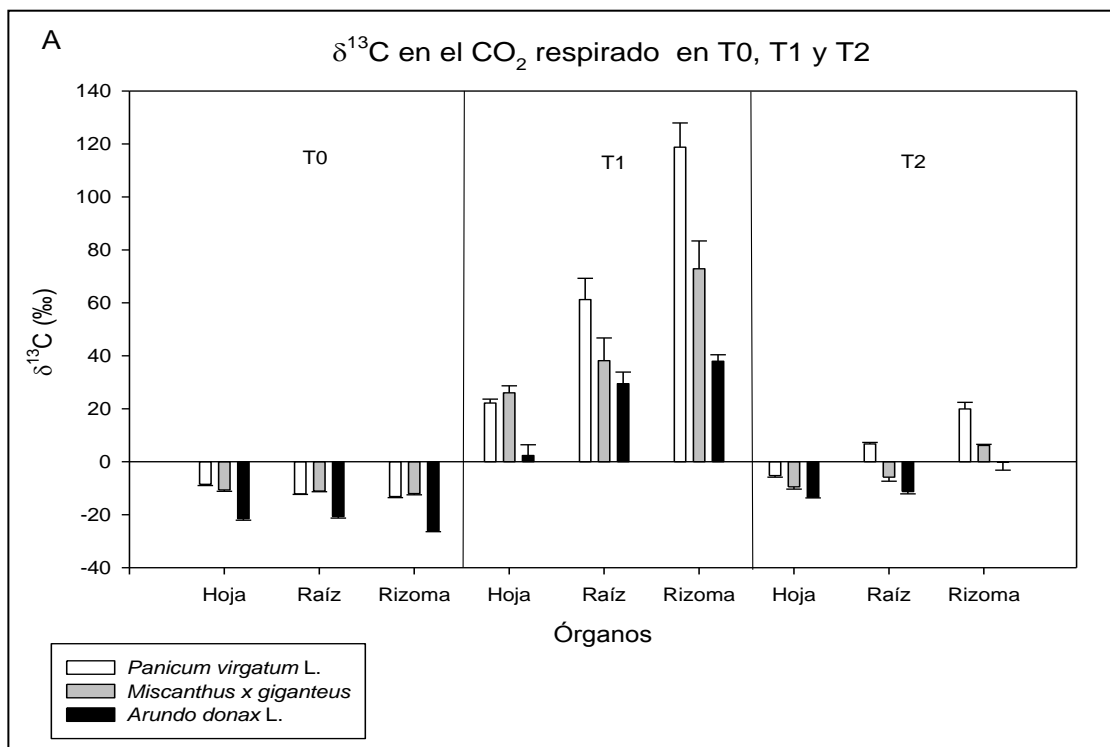
**Figure 4.1.9** Composición isotópica de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ) del  $\text{CO}_2$  en la cámara de ambiente controlado CONVIRON. Las muestras de aire fueron tomadas antes de inyectar el  $\text{CO}_2$  enriquecido con  $^{13}\text{C}$  (pre-marcaje) y luego cada 2 horas durante 8 h. Se aplicaron dos dosis de  $\text{CO}_2$  enriquecido con  $^{13}\text{C}$  por día, a las 9 y a las 13h.

Los resultados de la  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  respirado en la oscuridad de cada órgano (hojas, raíces y rizomas) se muestran en la Fig. 4.1.10 A. Previo al momento de marcaje ( $T_0$ ), la  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  respirado de los órganos estuvo empobrecido de  $^{13}\text{C}$  respecto al  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  del aire en las tres especies y se observaron diferencias significativas entre especies C4 y la C3. Las plantas C4 presentaron valores de  $\delta^{13}\text{C}$  entre  $-9$  y  $-12 \text{‰}$  y la planta C3 alrededor de  $-21 \text{‰}$ . En switchgrass, los órganos que tuvieron un  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  respirado más empobrecidos con  $^{13}\text{C}$  fueron la raíz y el rizoma; en miscantus no se observaron diferencias entre órganos y en la caña común fue el rizoma. Después de 24h de marcaje ( $T_1$ ), los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  en el  $\text{CO}_2$  respirado mostraron valores positivos, para todos los órganos en las tres especies, esto indicó que las plantas asimilaron  $^{13}\text{CO}_2$  y lo incorporaron a su metabolismo. Si bien todos los órganos tuvieron valores de  $\delta^{13}\text{C}$  positivos en el  $\text{CO}_2$  respirado, el órgano más enriquecido para las tres especies fue el rizoma. Una semana después del marcaje ( $T_2$ ), la cantidad de  $^{13}\text{C}$  en el  $\text{CO}_2$  respirado disminuyó

en las tres especies y el  $\delta^{13}\text{C}$  en el  $\text{CO}_2$  respirado tomó valores negativos en la mayoría de los órganos. Sin embargo, algunos órganos como la raíz de switchgrass y el rizoma en las tres especies permanecieron ligeramente enriquecidos en T2.

#### 4.1.3.2 Composición isotópica de $^{13}\text{C}$ en la materia orgánica total (MOT)

Composición isotópica de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ) en la materia orgánica de los diferentes órganos (hoja, tallo, raíz y rizoma) se muestran en la Fig. 4.1.10 B. Las muestras de MOT en T0 (pre-marcaje) estuvieron empobrecidas de  $^{13}\text{C}$  respecto al  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  del aire para las tres especies. Sin embargo, hubo diferencias en la composición isotópica entre las especies C3 y las C4, las plantas C4 presentaron valores que variaron entre -13 ‰ y -12 ‰ y la planta C3 entre -32 ‰ y -30 ‰ y no se observaron diferencias significativas entre los órganos dentro de la misma especie. En T1 (24 h de marcaje) al igual que en  $\text{CO}_2$  respirado, la MOT de todos los órganos estuvo enriquecida con  $^{13}\text{C}$  debido a la asimilación de  $^{13}\text{CO}_2$  en la cámara durante el marcaje. Se observaron diferencias significativas en el  $\delta^{13}\text{C}$  entre órganos de cada especie, siendo el órgano más enriquecido el tallo. En switchgrass observamos que el tallo fue órgano más enriquecimiento en comparación con las hojas, raíz y el rizoma y no presentaron diferencia significativas entre ellos. En miscantus y caña común el tallo y rizoma fueron los órganos más enriquecimiento. En T2 (7 días después del marcaje), los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  en MOT tomaron valores negativos en la mayoría de órganos, excepto en raíz y rizoma de las plantas C4 y en rizoma de la planta C3.



**Figure 4.1.10.** A) Composición isotópica de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ) del  $\text{CO}_2$  respirado en la oscuridad por los diferentes órganos de la planta (hoja, raíz y rizoma); B) Composición isotópica de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ) de la materia orgánica total en los diferentes órganos (hoja, tallo, raíz y rizoma) de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. Las muestras de aire y materia seca fueron tomadas en tres momentos: T0 (pre-marcaje), T1 (24 h de marcaje) y T2 (7 días después del marcaje). Los valores son la media  $\pm$  SE de cuatro replicas ( $n=4$ ). El análisis estadístico se muestra en la tabla S2 y S3 del apartado Anexos.

#### 4.1.3.3 Discriminación del $^{13}\text{C}$ en la MOT y proporción de carbono nuevo (% $C_{\text{nuevo}}$ )

Los valores de discriminación contra el  $^{13}\text{C}$  en la MOT de la hoja son presentados en la tabla 4.1.3. La especie C3, caña común, tuvo el mayor valor de  $\Delta^{13}\text{C}$  comparado con las plantas C4, y a su vez, no hubo diferencias significativas entre ellas. La tabla 4.1.4 muestra la proporción de nuevo carbono en el  $\text{CO}_2$  respirado de cada órgano en las tres especies. La planta C3 tuvo mayor % $C_{\text{nuevo}}$  en comparación con las C4, y entre las C4 no hubo diferencias. Y si comparamos entre órganos, el que tuvo mayor proporción de  $C_{\text{nuevo}}$  fue el rizoma. Si observamos las proporciones de  $C_{\text{nuevo}}$  en la MOT (tabla 4.1.5) sigue la misma tendencia, la caña común tuvo mayor % $C_{\text{nuevo}}$  que switchgrass y miscantus, pero los órganos con mayor % fueron hoja y tallo.

**Tabla 4.1.3.** Discriminación isotópica de carbono ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) en la materia orgánica en hojas de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones controladas. Letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las especies.

| Parámetro             | Especies                   |                               |                          |
|-----------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------------------|
|                       | <i>Panicum virgatum</i> L. | <i>Miscanthus x giganteus</i> | <i>Arundo donax</i> L.   |
| $\Delta^{13}\text{C}$ | 1,79 $\pm 0,09\text{a}$    | 1,69 $\pm 0,21\text{a}$       | 21,34 $\pm 0,10\text{b}$ |

**Tabla 4.1.4.** Porcentaje (%) de Carbono Nuevo en el  $\text{CO}_2$  respirado por los diferentes órganos (hoja, raíz y rizoma) de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. luego de realizado el marcaje con carbono 13. Los valores son las medias  $\pm$  SE de cuatro repeticiones ( $n = 4$ ). Letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las especies y letras minúsculas diferencias entre órganos dentro una misma especie.

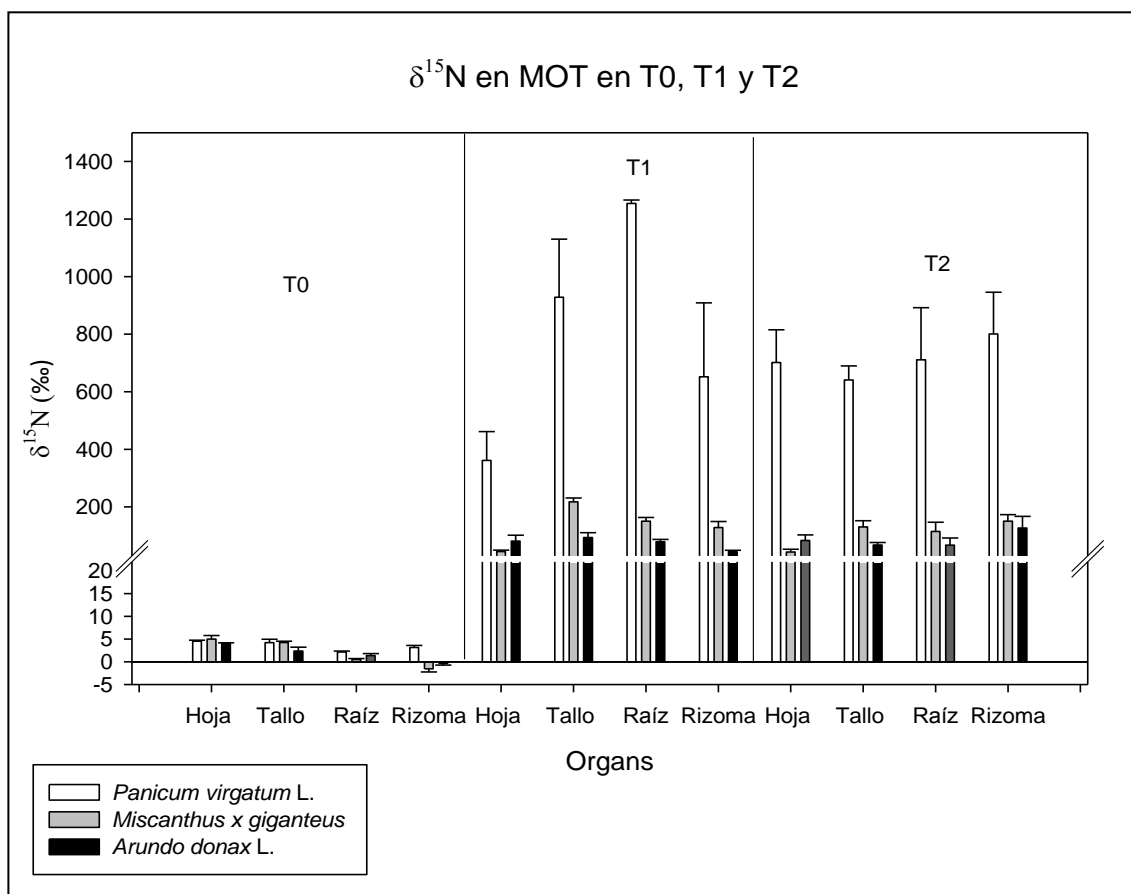
| Órganos | Especies                   |                               |                          |
|---------|----------------------------|-------------------------------|--------------------------|
|         | <i>Panicum virgatum</i> L. | <i>Miscanthus x giganteus</i> | <i>Arundo donax</i> L.   |
| Hoja    | 3,11 $\pm 0,17\text{Aa}$   | 3,90 $\pm 0,19\text{Aa}$      | 7,86 $\pm 0,23\text{Ba}$ |
| Raíz    | 4,44 $\pm 0,08\text{Ab}$   | 4,04 $\pm 0,09\text{Aa}$      | 7,56 $\pm 0,23\text{Ba}$ |
| Rizoma  | 4,88 $\pm 0,13\text{Ac}$   | 4,41 $\pm 0,17\text{Ab}$      | 9,51 $\pm 0,15\text{Bb}$ |

**Tabla 4.1.5.** Porcentaje (%) de Carbono Nuevo en la MOT de los diferentes órganos (hoja, tallo, raíz y rizoma) de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. luego de realizado el marcaje con carbono 13. Los valores son las medias  $\pm$  SE de cuatro repeticiones ( $n = 4$ ). Letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las especies y letras minúsculas diferencias entre órganos dentro una misma especie.

| Órganos | Especies                   |                               |                        |
|---------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|
|         | <i>Panicum virgatum</i> L. | <i>Miscanthus x giganteus</i> | <i>Arundo donax</i> L. |
| Hoja    | 4,85 $\pm$ 0,03Aa          | 4,81 $\pm$ 0,08Aa             | 12,00 $\pm$ 0,04Ba     |
| Tallo   | 4,84 $\pm$ 0,05Aa          | 4,83 $\pm$ 0,01Aa             | 11,94 $\pm$ 0,06Ba     |
| Raíz    | 4,66 $\pm$ 0,09Aa          | 4,70 $\pm$ 0,05Aa             | 11,45 $\pm$ 0,10Bb     |
| Rizoma  | 4,71 $\pm$ 0,04Aa          | 4,56 $\pm$ 0,06Ab             | 11,13 $\pm$ 0,25Bb     |

#### 4.1.3.4 Composición isotópica de $^{15}\text{N}$ en la materia orgánica total (MOT)

Las muestras de MOT mostraron un empobrecimiento de  $^{15}\text{N}$  en T0 (Fig. 4.1.11), es decir observamos valores entre 0 y 5 ‰, dentro de los rangos normales de abundancia natural. En T1 (24h de realizado el marcaje con  $^{15}\text{NO}_3$   $^{15}\text{NH}_4$ ) observamos que las muestras de MOT se enriquecieron con  $^{15}\text{N}$  en las tres especies, siendo el switchgrass la especie más enriquecida. El tallo fue el órgano con valores más positivos de  $^{15}\text{N}$  switchgrass y caña común, en comparación con el resto de órganos. En miscanthus no hubo diferencias significativas entre órganos. En T2, a diferencia del comportamiento del  $^{13}\text{C}$  que se fue empobreciendo, los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) en las muestras de MOT permanecieron enriquecidos después de una semana de finalización del marcaje.



**Figure 4.1.11.** Composición isotópica de  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) en la materia orgánica total en los diferentes órganos (hoja, tallo, raíz y rizoma) de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. Las muestras de materia seca fueron tomadas en tres momentos: T0 (pre-marcaje), T1 (24 h de marcaje) y T2 (7 días después del marcaje). Los valores son la media  $\pm$  SE de cuatro replicas ( $n=4$ ). El análisis estadístico se muestra en la tabla S4 del apartado Anexos.

#### 4.1.3.5 Contenidos de C (%) y N (%) y relación C/N en la materia orgánica total (MOT)

En general, la MOT en estas especies presentó valores alrededor de un 40% C (Tabla 4.1.7) y no hubo diferencias significativas en el contenido de C entre los diferentes órganos de una misma especie. El contenido de nitrógeno (Tabla 4.1.8) fue bajo y se observaron diferencias entre C3 y C4. La hoja fue el órgano con mayor contenido de N con respecto al resto de órganos en las tres especies. Las relaciones C/N fueron mayores en tallo de las plantas C4 (Tabla 4.1.9)

**Tabla 4.1.7.** Contenido de carbono (%) en la MOT de los diferentes órganos (hoja, tallo, raíz y rizoma) de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. Los valores son las medias  $\pm$  SE de cuatro repeticiones ( $n = 4$ ). Letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las especies y letras minúsculas diferencias entre órganos dentro una misma especie.

| Órganos | Especies                   |                               |                        |
|---------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|
|         | <i>Panicum virgatum</i> L. | <i>Miscanthus x giganteus</i> | <i>Arundo donax</i> L. |
| Hoja    | 2,76 $\pm$ 0,77 ABa        | 2,06 $\pm$ 0,09 Ba            | 4,14 $\pm$ 0,21 Aa     |
| Tallo   | 0,46 $\pm$ 0,04 Bc         | 0,68 $\pm$ 0,03 Bd            | 1,94 $\pm$ 0,28 Ab     |
| Raíz    | 1,37 $\pm$ 0,16 Bb         | 1,89 $\pm$ 0,03 Ab            | 1,93 $\pm$ 0,14 Ab     |
| Rizoma  | 1,32 $\pm$ 0,01 Bb         | 1,58 $\pm$ 0,03 Ac            | 1,66 $\pm$ 0,09 Ab     |

**Tabla 4.1.8.** Contenido de nitrógeno (%) en la MOT de los diferentes órganos (hoja, tallo, raíz y rizoma) de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. Los valores son las medias  $\pm$  SE de cuatro repeticiones ( $n = 4$ ). Letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las especies y letras minúsculas diferencias entre órganos dentro una misma especie.

| Órganos | Especies                   |                               |                        |
|---------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|
|         | <i>Panicum virgatum</i> L. | <i>Miscanthus x giganteus</i> | <i>Arundo donax</i> L. |
| Hoja    | 37,86 $\pm$ 4,72 Aa        | 42,04 $\pm$ 0,30 Ba           | 39,48 $\pm$ 0,97 Aa    |
| Tallo   | 41,88 $\pm$ 1,36 Aa        | 41,13 $\pm$ 0,58 Aa           | 40,96 $\pm$ 0,45 Aa    |
| Raíz    | 41,86 $\pm$ 0,35 Aa        | 41,86 $\pm$ 0,30 Aa           | 41,10 $\pm$ 1,18 Aa    |
| Rizoma  | 41,10 $\pm$ 0,58 Aa        | 43,00 $\pm$ 0,57 Ba           | 40,17 $\pm$ 2,28 Aa    |

**Tabla 4.1.9.** Relación C/N en la MOT de los diferentes órganos (hoja, tallo, raíz y rizoma) de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. Los valores son las medias  $\pm$  SE de cuatro repeticiones ( $n = 4$ ). Letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las especies y letras minúsculas diferencias entre órganos dentro una misma especie.

| Órganos | Especies                   |                               |                        |
|---------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|
|         | <i>Panicum virgatum</i> L. | <i>Miscanthus x giganteus</i> | <i>Arundo donax</i> L. |
| Hoja    | 16,36 $\pm$ 3,17 Ac        | 20,53 $\pm$ 0,94 Ac           | 9,57 $\pm$ 0,37 Bb     |
| Tallo   | 92,01 $\pm$ 6,46 Aa        | 61,00 $\pm$ 2,69 Ba           | 22,39 $\pm$ 3,15 Ca    |
| Raíz    | 31,90 $\pm$ 3,65 Ab        | 22,15 $\pm$ 0,48 Bc           | 21,69 $\pm$ 2,03 Ba    |
| Rizoma  | 31,08 $\pm$ 0,56 Ab        | 27,20 $\pm$ 0,21 ABb          | 24,55 $\pm$ 2,58 Ba    |



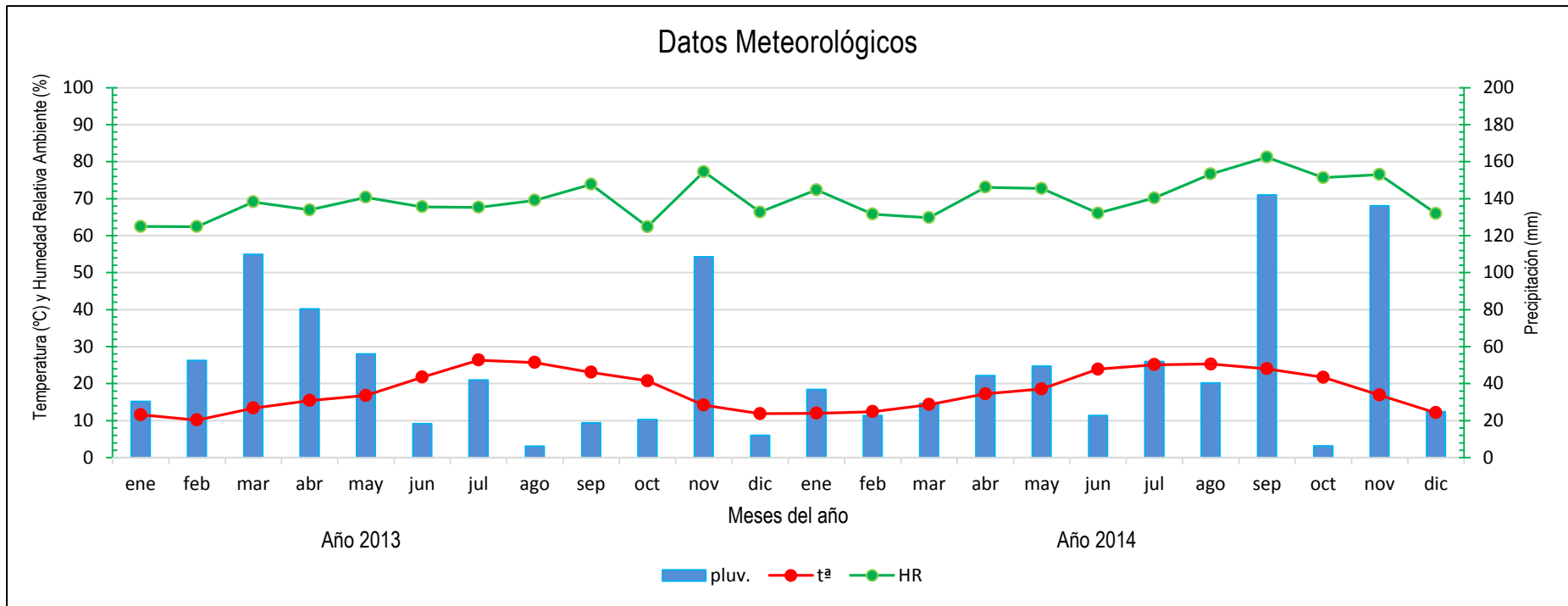
## 4.2. EXPERIMENTO II: CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS TRES ESPECIES EN CONDICIONES DE CLIMA MEDITERRÁNEO

### 4.2.1. Condiciones ambientales

A partir de los datos de temperatura (°C) y humedad relativa ambiente (%) aportados por la estación meteorológica del Departamento de Astronomía y Meteorología de la Facultad de Física de la Universidad de Barcelona y los datos de precipitación mensual recogidos del pluviómetro ubicado en los SCE, correspondientes a los años 2013 y 2014, se obtuvo la figura 4.2.1. La precipitación total en el año 2013 fue de 555,60 mm y en 2014 de 606,90 mm. La distribución anual de la precipitación fue del tipo bimodal, es decir las lluvias estuvieron repartidas en dos periodos: otoño y primavera, mientras que los periodos más secos fueron los correspondientes al invierno y al verano, característico de clima Mediterráneo.

Se observó que en el año 2013 las precipitaciones estuvieron más concentradas en la estación de primavera (246,3 mm) y el verano fue muy seco (66,5 mm), mientras que en 2014 el otoño fue más lluvioso (284,5 mm) y el verano también lo fue (114,9 mm). Las mayores temperaturas se registraron en los meses de verano y fueron acompañados de menores porcentaje de humedad ambiente con respecto a los demás meses.

La parcela A, que denominamos condiciones de regadío, tuvo un riego suplementario durante los 4 meses de verano (junio, julio agosto y septiembre), por lo cual esta superficie de cultivo recibió un total de 200 mm que fueron dosificados en 50 mm mes<sup>-1</sup>. La suma de la precipitación anual y los 200 mm extras recibidos durante estos meses, hicieron una cantidad total de agua recibida en esa en la parcela de 755,6 mm para el año 2013 y de 806,9 mm para 2014. La parcela B, que denominamos condiciones de secano, no recibió ningún riego suplementario durante los cuatro meses de verano, sólo recibió agua de lluvia precipitada.



**Figura 4.2.1.** Datos de temperatura (°C) y humedad relativa ambiente (%) media mensual, aportados por la estación meteorológica del Departamento de Astronomía y Meteorología de la Facultad de Física de la Universidad de Barcelona, y datos de precipitación mensual recogidos del pluviómetro, ubicado en el Servicio de Campos Experimentales de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona correspondientes a los años 2013 y 2014.

## 4.2.2. Medidas de crecimiento

### 4.2.2.1. Altura del tallo y producción de materia seca por planta

La altura de todas las plantas en condiciones de regadío (parcela con riego suplementario) mostró un aumento progresivo a lo largo de los diferentes momentos de medición (T0, T1 y T2). Al final del experimento, la caña común fue la especie que presentó mayor altura seguida de miscantus y switchgrass. Si comparamos este mismo parámetro entre años en regadío, se observó la misma tendencia pero la altura en T2 fue mayor en 2014 que 2013 en las tres especies. En condiciones de secano, switchgrass presentó la misma tendencia de crecimiento a lo largo del tiempo que en condiciones regadío, pero el crecimiento fue menor y tuvo el mismo comportamiento en 2014 (Fig. 4.2.2 A1 y A2). Miscantus fue la especie más afectada por la falta de agua, ya que no se observó un aumento de la altura del tallo a lo largo de experimento y se comportó del mismo modo en 2014 (Fig. 4.2.2 B1 y B2). La caña común siguió siendo la especie de mayor altura comparada con las C4 y no presentó diferencias significativas entre el tratamiento de condiciones de regadío y de secano en 2013, solamente en T2 del año 2014 se pudo observar diferencias entre estos dos tratamientos (Fig. 4.2.2 C1 y C2).

La producción de materia seca fue medida al final del experimento (Fig. 4.2.3), una vez que las plantas estuvieron secas. En condiciones regadío se obtuvieron los mayores PS de la parte aérea con respecto al tratamiento de secano. Siendo la caña común la que tuvo una mayor producción de biomasa comparado con las especies C4. Si comparamos el comportamiento de cada especie frente al déficit hídrico, observamos que switchgrass en condiciones de secano tuvo una reducción de producción de biomasa de un 40% con respecto al regadío y se comportó de la misma manera en el año 2014 (Fig. 4.2.3 A). Miscantus en 2013 produjo un 40% menos que en regadío y en 2014 solo alcanzó un 10% de producción comparado con el regadío (Fig. 4.2.3 B) y la caña común en 2013 en secano la producción se redujo en un 30% y en 2014 solo en un 25% (Fig. 4.2.3 C).

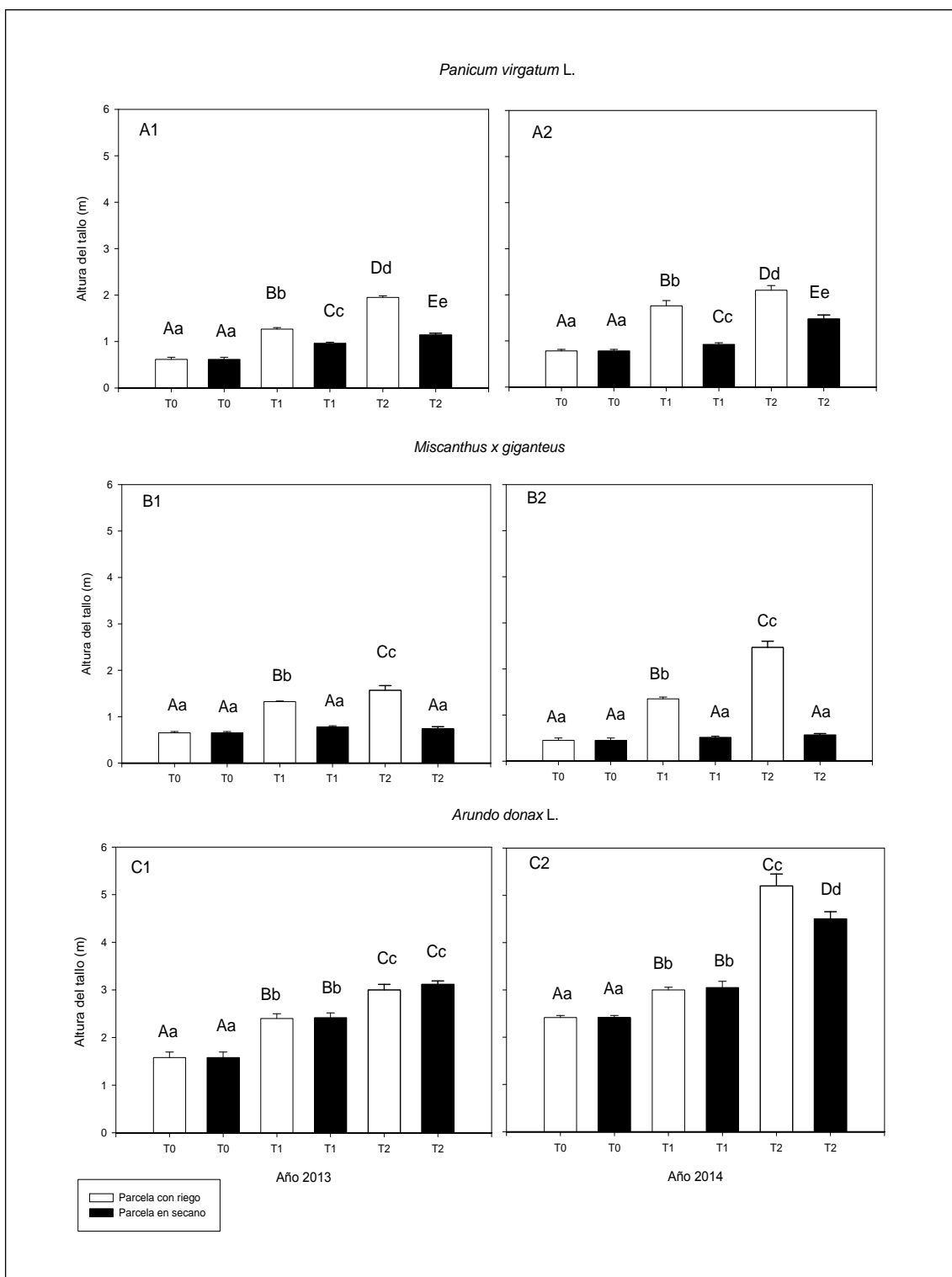
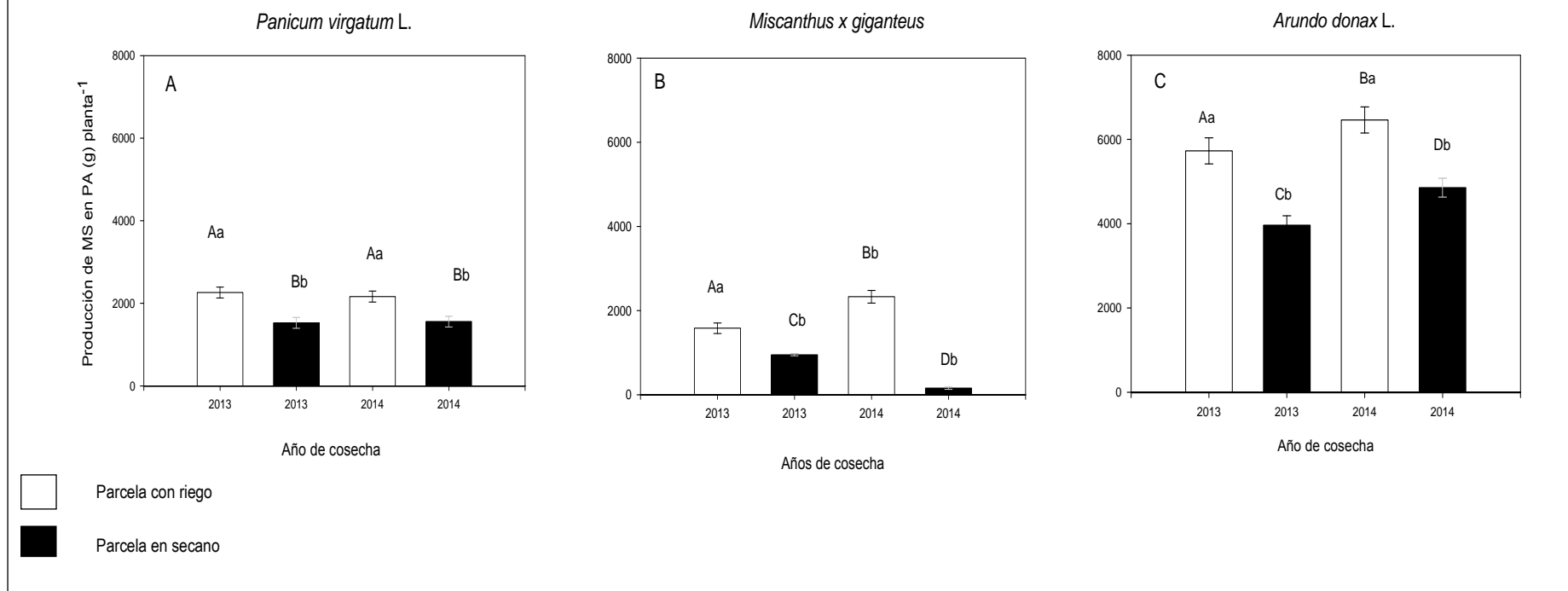


Figura 4.2.2. Altura (m) de las plantas crecidas en condiciones de riego y seco, medida en diferentes momentos (T0: primavera; T1: principio de verano y T2: finales de verano). A1) Altura (m)/ planta de *Panicum virgatum* L. en 2013; A2) Altura (m)/ planta de *Panicum virgatum* L. en 2014; B1) Altura (m)/ planta de *Miscanthus x giganteus* en 2013; B2) Altura (m)/ planta de *Miscanthus x giganteus* en 2014; C1) Altura (m)/ planta de *Arundo donax* L. en 2013 y C2) Altura (m)/ planta de *Arundo donax* L. en 2014. Los valores representan la media  $\pm$  SE de cuatro réplicas (n=4). Dentro de una misma especie y año, letras mayúsculas indican diferencias significativas (P < 0,05) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias (P < 0,05) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición y año.

### Producción de MS (Parte Aérea) al momento de cosecha



**Figura 4.2.3.** Peso seco (g) de la parte aérea (PA) en las plantas crecidas en condiciones de riego y secano en diferentes años (2013 y 2014). A) PS (g)/ planta en *Panicum virgatum* L.; B) PS (g)/ planta en *Miscanthus x giganteus*; C) PS (g)/ planta en *Arundo donax* L. Los valores representan la media  $\pm$  SE de cuatro réplicas ( $n=4$ ). Dentro de una misma especie, letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre años para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos dentro de un mismo año.

### 4.2.3. Medidas fisiológicas

#### 4.2.3.1. Medidas de intercambio de gases foliar

En general, podemos observar que en condiciones de regadío, las plantas tuvieron un mejor comportamiento que en condiciones de secano. Si comparamos entre especies, la caña común fue la que presentó los mayores valores de  $A_{sat}$ ,  $A_{max}$ ,  $g_s$ ,  $V_{c, max}$  y  $J_{max}$  en comparación con switchgrass y miscantus; a su vez entre las C4 se observaron respuestas similares. Si comparamos el comportamiento cada especie a lo largo del tiempo vemos que, en el año 2013, en condiciones de regadío, switchgrass no presentó diferencias significativas entre T0 y T1, pero en T2 disminuyó un 25%  $A_{sat}$ , 27%  $A_{max}$ , 30%  $g_s$ , 23%  $J_{max}$  y un aumento de 7%  $V_{c, max}$ . Mientras que, en condiciones de secano, no se mantuvieron los mismos valores entre T0 y T1, sino que en T1 hubo una disminución del 80%  $A_{sat}$ , 77%  $A_{max}$ , 88%  $g_s$ , 60%  $V_{c, max}$ , 70%  $J_{max}$  y en T2 se mantuvieron los mismos valores. El mismo patrón de comportamiento se observó en el año 2014 (Tabla 4.2.1).

Miscantus, en 2013, bajo condiciones de regadío, mostró el mismo comportamiento que switchgrass (Tabla 4.2.2), es decir mantuvo los mismos valores durante T0 y T1 pero en T2 hubo disminuciones en parámetros de 37,5%  $A_{sat}$ , 40%  $A_{max}$ , 50%  $g_s$ , 27%  $J_{max}$  y un aumento de 30%  $V_{c, max}$ . En 2014, T0 y T1 también se mantuvieron pero la diferencia estuvo marcada en T2 donde los valores, en vez de disminuir así como en 2013, aumentaron un 16%  $A_{sat}$ ,  $A_{max}$  y  $V_{c, max}$ , 23%  $g_s$  y 43%  $J_{max}$ . En condiciones de secano, tanto en el año 2013 como 2014, hubo una disminución desde T0 a T1 en todos los parámetros medidos, la diferencia estuvo que en 2013 la disminución fue mayor (85%  $A_{sat}$ , 73%  $A_{max}$ , 83%  $g_s$ , 80%  $V_{c, max}$  y 70%  $J_{max}$ ) con respecto a 2014 (60%  $A_{sat}$ , 64%  $A_{max}$ , 77%  $g_s$ , 65%  $V_{c, max}$  y 75%  $J_{max}$ ). Y al momento T2 todas las plantas presentaron senescencia foliar.

Finalmente, la caña común en condiciones de regadío (Tabla 4.2.3), en el año 2013 mostró disminuciones en T1 con respecto a T0 en los diferentes parámetros, pero luego en T2 aumentaron a excepción de  $g_s$  que no presentó diferencias significativas entre tiempos. Las disminuciones en T1 fueron cercanas al 30-35% en  $A_{sat}$  y  $A_{max}$ , y de un 4% en  $J_{max}$ . En T2 los incrementos fueron de 22%  $A_{sat}$ , 34%  $A_{max}$ , 8%  $V_{c, max}$  y 35%  $J_{max}$ . En 2014, no hubo diferencias entre T0 y T1 para  $A_{sat}$ , pero hubo disminuciones del 22% en T2, el resto de parámetros tuvieron valores diferentes entre T0 y T1 con disminuciones 8%  $A_{max}$ , 25%  $g_s$ , 16%  $J_{max}$  y aumentos del 52% en  $V_{c, max}$ . En T2 continuaron las disminuciones: 26%  $A_{max}$ , 48 %  $V_{c, max}$  y 28 %  $J_{max}$  y aumentos de 22 % para  $g_s$ . En condiciones de secano, para el año 2013, hubo diferencia entre T0 y T1 donde se observaron reducciones entre 40 y 45% para  $A_{sat}$ ,  $A_{max}$  y  $J_{max}$ , 65%  $g_s$  y un

incremento del 62%  $V_{c, max}$ . En T2 disminuyó 50%  $A_{sat}$ , 70%  $V_{c, max}$ , 6,50  $J_{max}$ , aumentó en un 10%  $A_{max}$  y  $g_s$  permaneció igual que en T1. En el año 2014, hubo diferencias a lo largo de las mediciones y las disminuciones para T1 con respecto a T0 fueron: 35%- 40%  $A_{sat}$ ,  $A_{max}$ , y  $J_{max}$ , 72%  $g_s$ , 19%  $V_{c, max}$ . En T2 continuaron disminuyendo 33%  $A_{sat}$ , 40%  $A_{max}$ , 20%  $g_s$ , 42%  $V_{c, max}$  y 45%  $J_{max}$ .

#### 4.2.3.2. Medidas de la fluorescencia modulada de las clorofilas

Se obtuvieron valores de rendimiento cuántico máximo del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ), medidos en la oscuridad, entre 0,7 para las especies C4 y valores de 0,8 para la C3 y no se observaron diferencias significativas entre tratamientos en un mismo momento de medición. Tampoco hubo diferencias entre tiempos para un mismo tratamiento y además se obtuvieron valores similares si comparamos 2013 y 2014 (Fig. 4.2.4). En general, las curvas de respuesta de la fotosíntesis a luz absorbida ( $A/PAR_i$ ) (Fig. 4.2.5) mostraron un aumento en las tasas de fotosíntesis neta a medida que se incrementó la cantidad de la luz hasta  $2000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  en las tres especies bajo condiciones regadío, siendo la especie C3 la que presentó mayores valores de asimilación de  $\text{CO}_2$ . En condiciones de secano hubo menores tasas de asimilación, switchgrass disminuyó en un 75%, miscantus un 80% y la caña común un 50% con respecto al regadío. Tanto switchgrass como la caña común tuvieron el mismo comportamiento en 2013 y 2014, siendo el miscantus el que presentó en 2014 más variabilidad en condiciones regadío y en secano la disminución fue menor. La eficiencia cuántica relativa del transporte de electrones del fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ) (Fig. 4.2.6), la eficiencia de la captura de la energía de excitación por los centros de reacción abiertos del fotosistema II ( $F_v'/F_m'$ ) (Fig. 4.2.7) y los valores de Quenching fotoquímico ( $qP$ ) (Fig. 4.2.8) disminuyeron a medida que aumentaron los niveles de luz, siendo más marcado la disminución de estos parámetros en las especies C4 en comparación con la C3 y este comportamiento fue el mismo en los dos años medidos. En condiciones de secano, la caña común no mostró diferencias significativas en comparación con el regadío y a su vez entre los diferentes momentos de medición, a diferencia de switchgrass y miscantus que sí presentaron diferencias entre tratamientos y entre los diferentes momentos de medición.

**Tabla 4.2.1.** Parámetros fotosintéticos medidos como tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub> a saturación de luz ( $A_{sat}$ ), tasa de fotosíntesis neta máxima ( $A_{max}$ ), conductancia estomática ( $g_s$ ), velocidad de carboxilación de la Rubisco ( $V_{c,max}$ ) y tasa de transporte de electrones ( $J_{max}$ ) medidos en plantas de *Panicum virgatum* L. crecidas en condiciones de riego y de secano. Las mediciones fueron tomadas en tres momentos (T0: primavera; T1: principio de verano y T2: finales de verano). Los valores son las medias  $\pm$  SE de tres repeticiones ( $n = 3$ ). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre años para un mismo parámetro, tiempo y tratamiento. Letras minúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tiempos para un mismo parámetro y año.

|   |        |             | Especie                    |                      |
|---|--------|-------------|----------------------------|----------------------|
|   |        |             | <i>Panicum virgatum</i> L. |                      |
| Parámetros  | Tiempo | Tratamiento | 2013                       | 2014                 |
| $A_{sat}$<br>( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )   | T0     | Riego       | 19,33 $\pm$ 1,45Aa         | 17,00 $\pm$ 1,00Aa   |
|   | T0     | Secano      | 19,33 $\pm$ 1,45Aa         | 17,00 $\pm$ 1,00Aa   |
|   | T1     | Riego       | 21,00 $\pm$ 1,50Aa         | 19,83 $\pm$ 3,35Aa   |
|   | T1     | Secano      | 4,50 $\pm$ 0,50Bb          | 5,07 $\pm$ 1,39Bb    |
|   | T2     | Riego       | 15,50 $\pm$ 2,18Cc         | 16,17 $\pm$ 1,17Cc   |
|   | T2     | Secano      | 3,17 $\pm$ 0,93Bb          | 5,33 $\pm$ 0,17Bb    |
| $A_{max}$<br>( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )   | T0     | Riego       | 26,03 $\pm$ 3,24Aa         | 29,15 $\pm$ 2,15Bb   |
|   | T0     | Secano      | 26,03 $\pm$ 3,24Aa         | 29,15 $\pm$ 2,15Bb   |
|   | T1     | Riego       | 26,60 $\pm$ 0,30Aa         | 25,57 $\pm$ 2,44Aa   |
|   | T1     | Secano      | 6,80 $\pm$ 0,34Cc          | 7,42 $\pm$ 2,14Cc    |
|   | T2     | Riego       | 19,90 $\pm$ 2,50Dd         | 26,23 $\pm$ 2,02Aa   |
|   | T2     | Secano      | 6,40 $\pm$ 1,02Cc          | 7,92 $\pm$ 1,79Cc    |
| $g_s$<br>( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )             | T0     | Riego       | 0,130 $\pm$ 0,010Aa        | 0,120 $\pm$ 0,010Aa  |
|   | T0     | Secano      | 0,130 $\pm$ 0,010Aa        | 0,120 $\pm$ 0,010Aa  |
|   | T1     | Riego       | 0,120 $\pm$ 0,004Aa        | 0,210 $\pm$ 0,005Bb  |
|   | T1     | Secano      | 0,014 $\pm$ 0,010Cc        | 0,030 $\pm$ 0,010Cc  |
|   | T2     | Riego       | 0,090 $\pm$ 0,003Dd        | 0,120 $\pm$ 0,003Aa  |
|   | T2     | Secano      | 0,016 $\pm$ 0,004Cc        | 0,030 $\pm$ 0,010Cc  |
| $V_{c,max}$<br>( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) | T0     | Riego       | 53,41 $\pm$ 5,09Aa         | 55,39 $\pm$ 6,74Aa   |
|   | T0     | Secano      | 53,41 $\pm$ 5,09Aa         | 55,39 $\pm$ 6,74Aa   |
|   | T1     | Riego       | 53,38 $\pm$ 0,84Aa         | 78,66 $\pm$ 15,28Bb  |
|   | T1     | Secano      | 24,08 $\pm$ 4,41Cc         | 20,16 $\pm$ 5,16Cc   |
|   | T2     | Riego       | 57,96 $\pm$ 10,27Dd        | 60,26 $\pm$ 3,60Dd   |
|   | T2     | Secano      | 6,51 $\pm$ 3,66Ee          | 19,48 $\pm$ 3,73Cc   |
| $J_{max}$<br>( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )     | T0     | Riego       | 90,80 $\pm$ 11,26Aa        | 146,38 $\pm$ 13,48Bb |
|   | T0     | Secano      | 90,80 $\pm$ 11,26Aa        | 146,38 $\pm$ 13,48Bb |
|   | T1     | Riego       | 120,52 $\pm$ 3,96Cc        | 150,80 $\pm$ 22,28Cc |
|   | T1     | Secano      | 30,15 $\pm$ 0,99De         | 32,75 $\pm$ 9,51Dd   |
|   | T2     | Riego       | 92,32 $\pm$ 15,20Aa        | 127,27 $\pm$ 11,44Bb |
|   | T2     | Secano      | 19,84 $\pm$ 6,11Ee         | 31,72 $\pm$ 4,08Dd   |

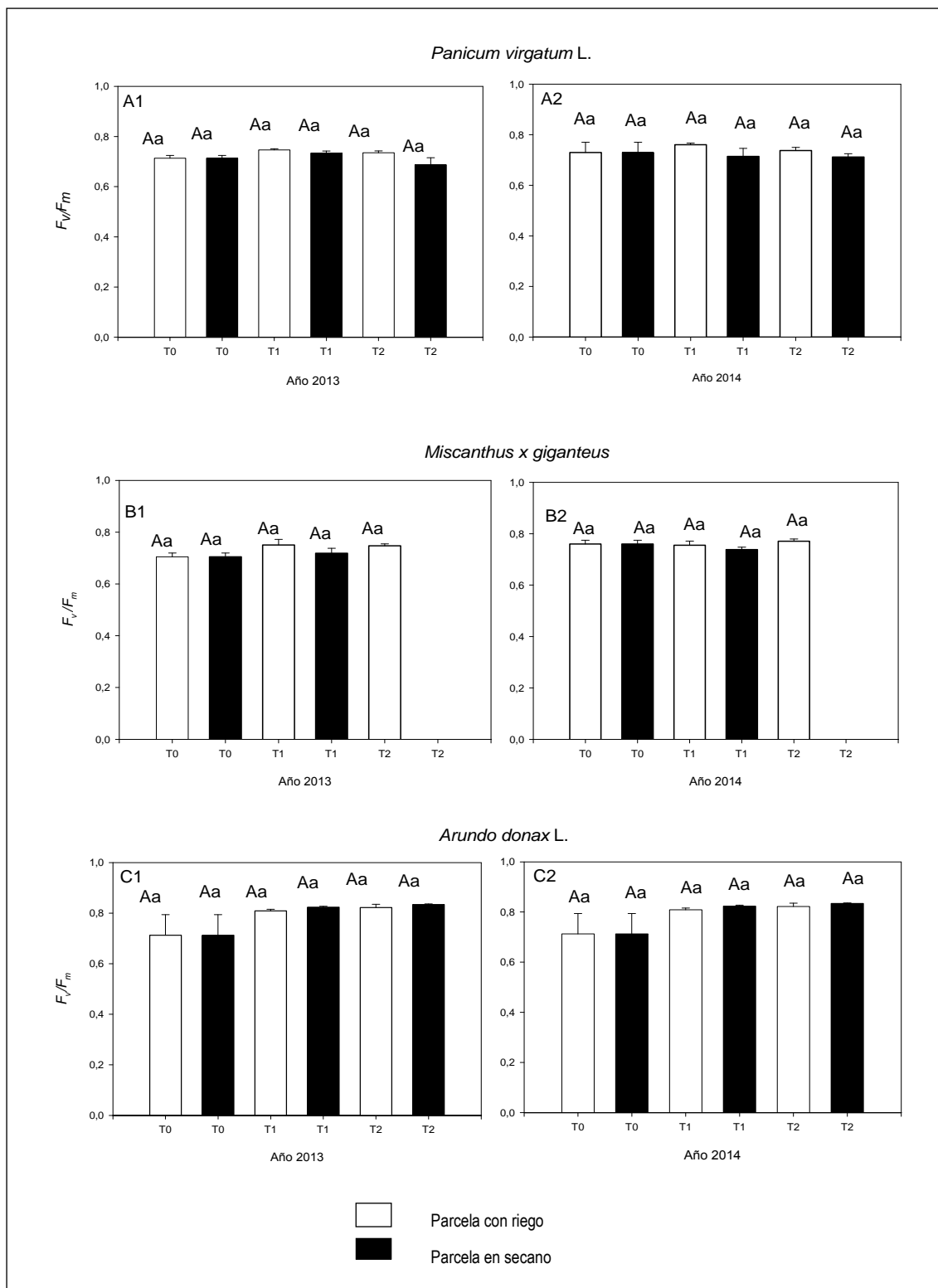


**Tabla 4.2.2.** Parámetros fotosintéticos: Tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub> a saturación de luz ( $A_{sat}$ ), tasa de fotosíntesis neta máxima ( $A_{max}$ ), conductancia estomática ( $g_s$ ), velocidad de carboxilación de la Rubisco ( $V_{c,max}$ ) y tasa de transporte de electrones ( $J_{max}$ ) medidos en plantas de *Miscanthus x giganteus* crecidas en condiciones de riego y de secano. Las mediciones fueron tomadas en tres momentos (T0: primavera; T1: principio de verano y T2: finales de verano). Los valores son las medias  $\pm$  SE de tres repeticiones ( $n = 3$ ). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre años para un mismo parámetro, tiempo y tratamiento. Letras minúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tiempos para un mismo parámetro y año.

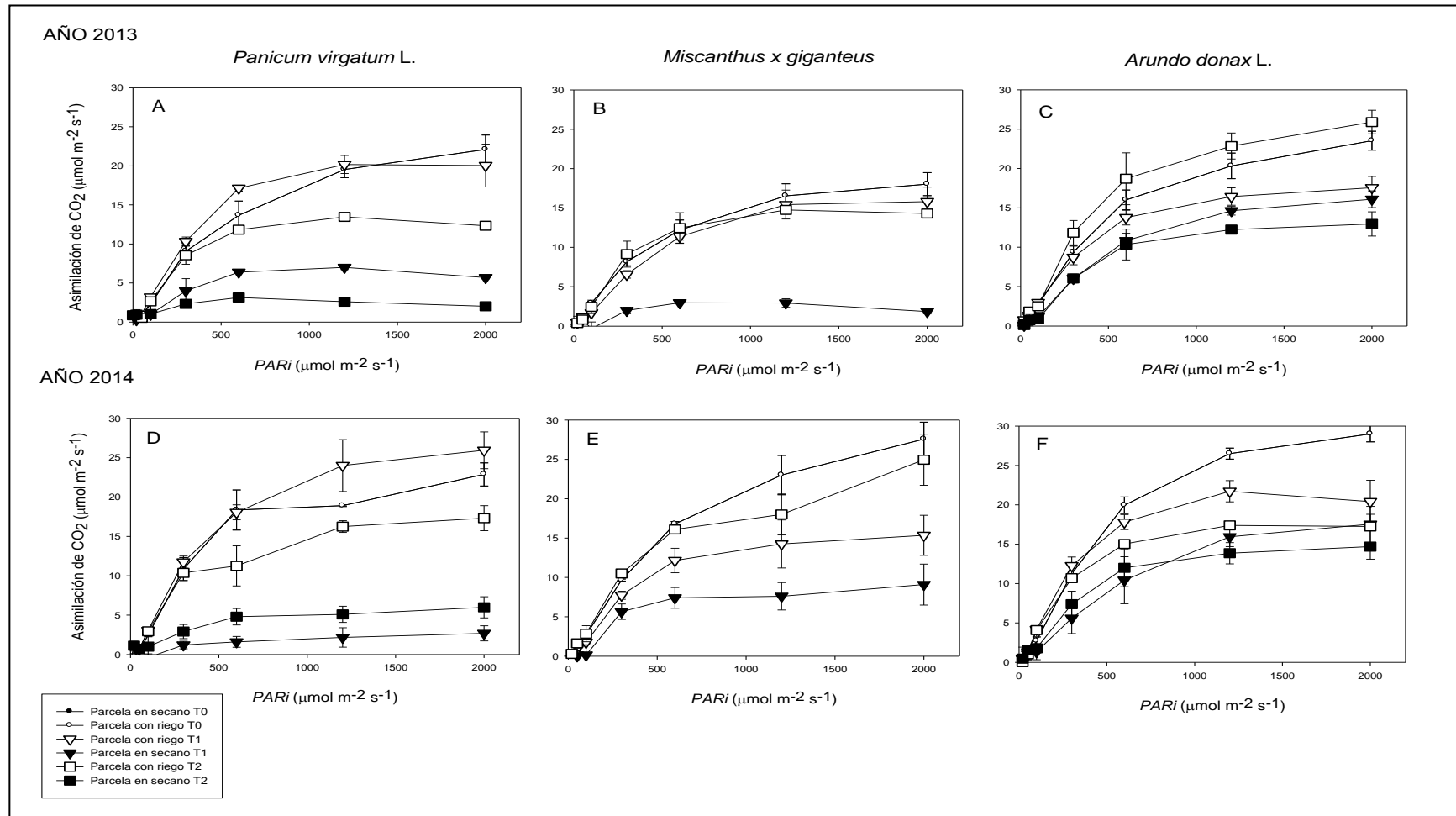
|   |        |             | Especie                       |                     |
|---|--------|-------------|-------------------------------|---------------------|
|   |        |             | <i>Miscanthus x giganteus</i> |                     |
| Parámetros  | Tiempo | Tratamiento | 2013                          | 2014                |
| $A_{sat}$<br>( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )   | T0     | Riego       | 17,67 $\pm$ 1,86Aa            | 18,50 $\pm$ 1,50Aa  |
|   | T0     | Secano      | 17,67 $\pm$ 1,86Aa            | 18,50 $\pm$ 1,50Aa  |
|   | T1     | Riego       | 16,17 $\pm$ 1,64Aa            | 17,33 $\pm$ 0,44Aa  |
|   | T1     | Secano      | 2,50 $\pm$ 0,76Bb             | 7,00 $\pm$ 4,00Cc   |
|   | T2     | Riego       | 9,83 $\pm$ 2,92Cc             | 21,50 $\pm$ 0,50Aa  |
|   | T2     | Secano      | nd                            | nd                  |
| $A_{max}$<br>( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )   | T0     | Riego       | 22,00 $\pm$ 3,71Aa            | 25,00 $\pm$ 0,00Bb  |
|   | T0     | Secano      | 22,00 $\pm$ 3,71Aa            | 25,00 $\pm$ 0,00Bb  |
|   | T1     | Riego       | 21,37 $\pm$ 2,21Aa            | 21,50 $\pm$ 0,26Aa  |
|   | T1     | Secano      | 6,13 $\pm$ 0,85Cc             | 9,02 $\pm$ 5,19Cc   |
|   | T2     | Riego       | 13,31 $\pm$ 4,07Dd            | 25,47 $\pm$ 1,62Bb  |
|   | T2     | Secano      | nd                            | nd                  |
| $g_s$<br>( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )             | T0     | Riego       | 0,124 $\pm$ 0,012Aa           | 0,135 $\pm$ 0,005Aa |
|   | T0     | Secano      | 0,124 $\pm$ 0,012Aa           | 0,135 $\pm$ 0,005Aa |
|   | T1     | Riego       | 0,120 $\pm$ 0,005Aa           | 0,104 $\pm$ 0,004Bb |
|   | T1     | Secano      | 0,020 $\pm$ 0,003Cc           | 0,035 $\pm$ 0,013Cc |
|   | T2     | Riego       | 0,060 $\pm$ 0,020Dd           | 0,160 $\pm$ 0,028Ee |
|   | T2     | Secano      | nd                            | nd                  |
| $V_{c,max}$<br>( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) | T0     | Riego       | 45,09 $\pm$ 5,45Aa            | 60,77 $\pm$ 9,82Bb  |
|   | T0     | Secano      | 45,09 $\pm$ 5,45Aa            | 60,77 $\pm$ 9,82Bb  |
|   | T1     | Riego       | 57,39 $\pm$ 2,56Bb            | 71,89 $\pm$ 3,10Bb  |
|   | T1     | Secano      | 9,29 $\pm$ 1,70Cc             | 21,79 $\pm$ 9,47Dd  |
|   | T2     | Riego       | 41,31 $\pm$ 12,16Aa           | 83,67 $\pm$ 3,14Ee  |
|   | T2     | Secano      | nd                            | nd                  |
| $J_{max}$<br>( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )   | T0     | Riego       | 73,38 $\pm$ 9,70Aa            | 127,50 $\pm$ 7,08Bb |
|   | T0     | Secano      | 73,38 $\pm$ 9,70Aa            | 127,50 $\pm$ 7,08Bb |
|   | T1     | Riego       | 93,00 $\pm$ 4,4Cc             | 102,46 $\pm$ 3,26Dd |
|   | T1     | Secano      | 26,49 $\pm$ 5,03Ee            | 31,58 $\pm$ 7,38Ee  |
|   | T2     | Riego       | 68,45 $\pm$ 9,54Aa            | 146,72 $\pm$ 8,06Ff |
|   | T2     | Secano      | nd                            | nd                  |

**Tabla 4.2.3.** Parámetros fotosintéticos: Tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub> a saturación de luz ( $A_{sat}$ ), tasa de fotosíntesis neta máxima ( $A_{max}$ ), conductancia estomática ( $g_s$ ), velocidad de carboxilación de la Rubisco ( $V_{c,max}$ ) y tasa de transporte de electrones ( $J_{max}$ ) medidos en plantas de *Arundo donax* L. crecidas en condiciones de riego y de secano. Las mediciones fueron tomadas en tres momentos (T0: primavera; T1: principio de verano y T2: finales de verano). Los valores son las medias  $\pm$  SE de tres repeticiones ( $n = 3$ ). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre años para un mismo parámetro, tiempo y tratamiento. Letras minúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tiempos para un mismo parámetro y año.

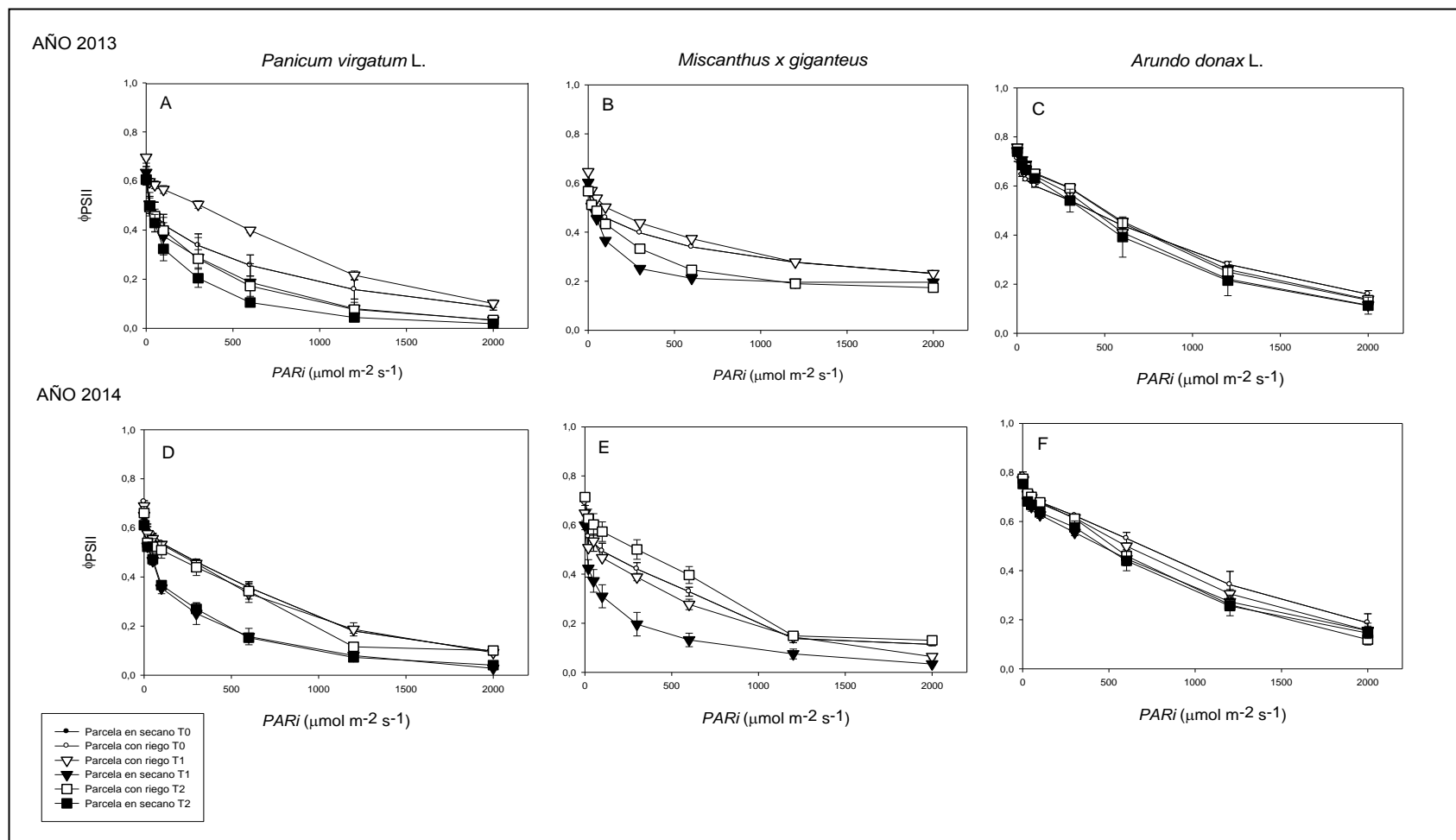
|   |        |             | Especie                |                      |
|---|--------|-------------|------------------------|----------------------|
|   |        |             | <i>Arundo donax</i> L. |                      |
| Parámetros  | Tiempo | Tratamiento | 2013                   | 2014                 |
| $A_{sat}$<br>( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )   | T0     | Riego       | 25,00 $\pm$ 1,53Aa     | 23,50 $\pm$ 2,50Aa   |
|   | T0     | Secano      | 25,00 $\pm$ 1,53Aa     | 23,50 $\pm$ 2,50Aa   |
|   | T1     | Riego       | 18,67 $\pm$ 3,59Aa     | 22,67 $\pm$ 0,67Aa   |
|   | T1     | Secano      | 14,83 $\pm$ 1,59Cc     | 15,67 $\pm$ 1,17Cc   |
|   | T2     | Riego       | 22,50 $\pm$ 3,50Aa     | 18,25 $\pm$ 3,75Aa   |
|   | T2     | Secano      | 7,14 $\pm$ 1,30Dd      | 10,33 $\pm$ 2,03Dd   |
| $A_{max}$<br>( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )   | T0     | Riego       | 35,97 $\pm$ 2,24Aa     | 38,20 $\pm$ 8,50Aa   |
|   | T0     | Secano      | 35,97 $\pm$ 2,24Aa     | 38,20 $\pm$ 8,50Aa   |
|   | T1     | Riego       | 23,30 $\pm$ 1,10Bb     | 35,33 $\pm$ 2,03Aa   |
|   | T1     | Secano      | 21,00 $\pm$ 2,20Bb     | 23,10 $\pm$ 3,27Bb   |
|   | T2     | Riego       | 31,00 $\pm$ 5,60Aa     | 26,20 $\pm$ 2,30Bb   |
|   | T2     | Secano      | 23,20 $\pm$ 2,20Bb     | 14,90 $\pm$ 2,21Cc   |
| $g_s$<br>( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )           | T0     | Riego       | 0,320 $\pm$ 0,020Aa    | 0,360 $\pm$ 0,050Aa  |
|   | T0     | Secano      | 0,320 $\pm$ 0,020Aa    | 0,360 $\pm$ 0,050Aa  |
|   | T1     | Riego       | 0,280 $\pm$ 0,050Aa    | 0,270 $\pm$ 0,050Aa  |
|   | T1     | Secano      | 0,110 $\pm$ 0,020Bb    | 0,109 $\pm$ 0,015Bb  |
|   | T2     | Riego       | 0,300 $\pm$ 0,020Aa    | 0,330 $\pm$ 0,080Aa  |
|   | T2     | Secano      | 0,100 $\pm$ 0,040Bb    | 0,082 $\pm$ 0,020Cc  |
| $V_{c,max}$<br>( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) | T0     | Riego       | 107,45 $\pm$ 10,75Aa   | 117,56 $\pm$ 10,24Aa |
|   | T0     | Secano      | 107,45 $\pm$ 10,75Aa   | 117,56 $\pm$ 10,24Aa |
|   | T1     | Riego       | 103,95 $\pm$ 14,08Aa   | 117,97 $\pm$ 6,76Aa  |
|   | T1     | Secano      | 173,24 $\pm$ 44,10Bb   | 95,44 $\pm$ 1,72Cc   |
|   | T2     | Riego       | 112,78 $\pm$ 29,90Aa   | 91,84 $\pm$ 22,77Dc  |
|   | T2     | Secano      | 51,37 $\pm$ 12,62Ee    | 55,01 $\pm$ 11,90Ee  |
| $J_{max}$<br>( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )   | T0     | Riego       | 208,13 $\pm$ 6,68Aa    | 278,13 $\pm$ 65,44Bb |
|   | T0     | Secano      | 208,13 $\pm$ 6,68Aa    | 278,13 $\pm$ 65,44Bb |
|   | T1     | Riego       | 137,93 $\pm$ 16,28Cc   | 233,17 $\pm$ 11,92Dd |
|   | T1     | Secano      | 123,44 $\pm$ 15,36Cc   | 156,71 $\pm$ 22,53Cc |
|   | T2     | Riego       | 185,88 $\pm$ 37,07Ee   | 168,63 $\pm$ 9,78Ee  |
|   | T2     | Secano      | 115,81 $\pm$ 15,36Cc   | 85,86 $\pm$ 14,51Fe  |



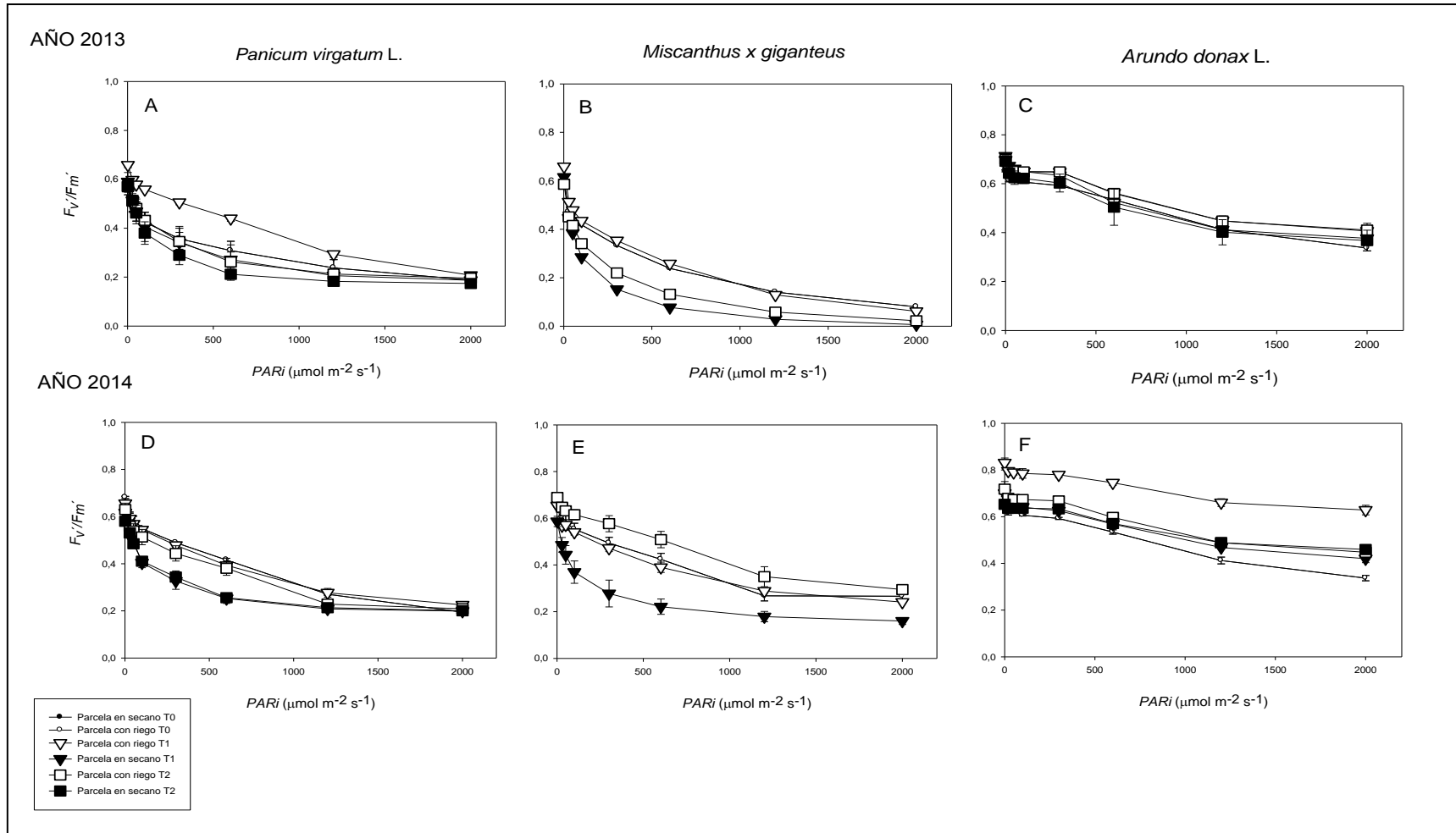
**Figura 4.2.4.** Medida de  $F_v/F_m$  de las plantas de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones de riego y seco y tomadas en diferentes momentos (T0: primavera; T1: principio de verano y T2: finales de verano). Los valores representan la media  $\pm$  SE de tres réplicas ( $n=3$ ). Dentro de una misma especie y año, letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.



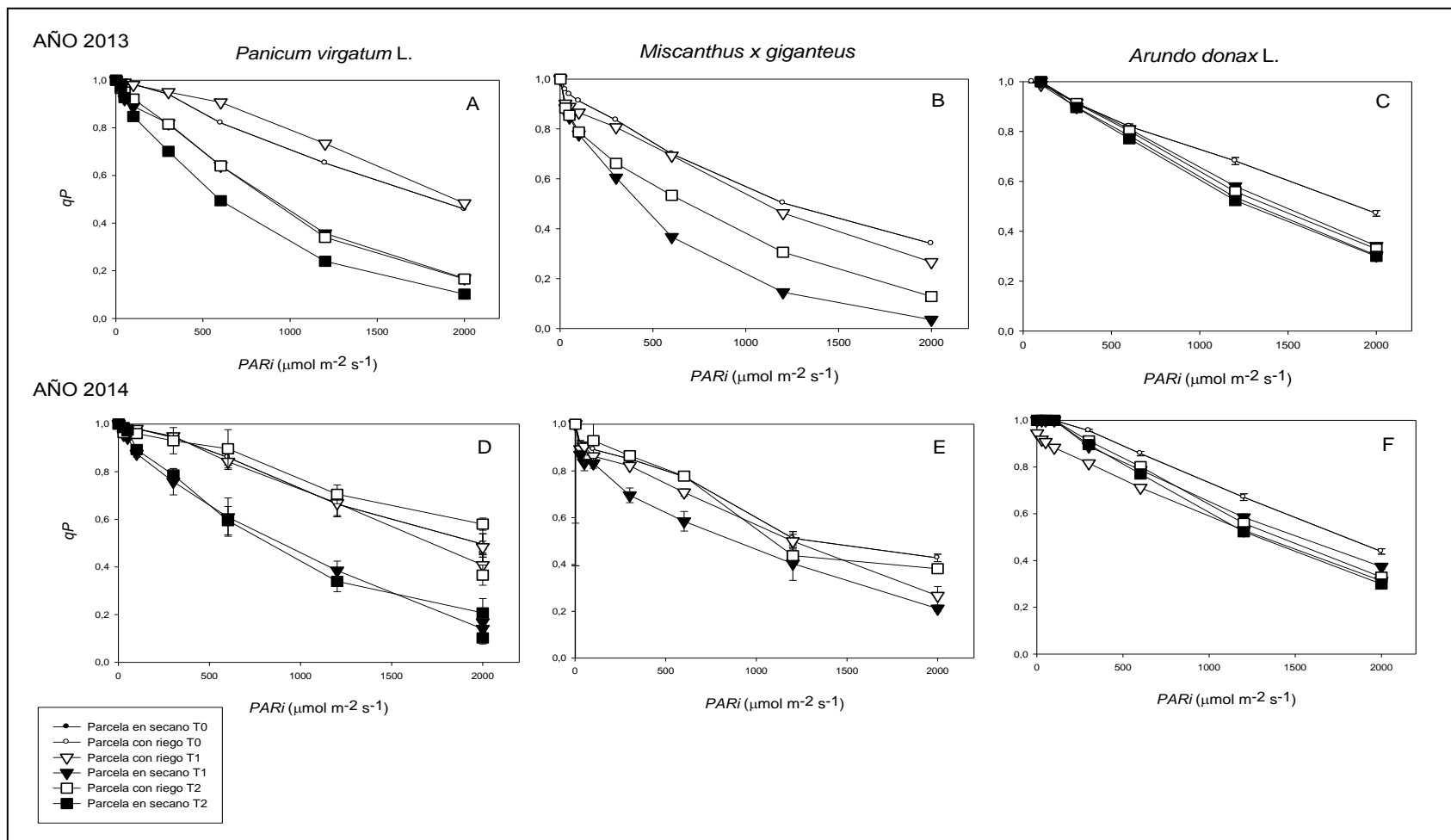
**Figura 4.2.5.** Curva de respuesta de la fotosíntesis a la luz ( $A/PAR_i$ ) en las plantas de *Panicum virgatum L.*, *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax L.* crecidas en condiciones de riego y secano y medido en diferentes momentos (T0: primavera; T1: principio de verano y T2: finales de verano). Los valores representan la media  $\pm$  SE de tres réplicas ( $n=3$ ).



**Figura 4.2.6.** Medida de la eficiencia cuántica relativa del transporte de electrones del fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ) en las plantas de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones de riego y secano y medido en diferentes momentos (T0: primavera; T1: principio de verano y T2: finales de verano). Los valores representan la media  $\pm$  SE de tres réplicas ( $n=3$ ).



**Figura 4.2.7.** Medida de la eficiencia de la captura de la energía de excitación por los centros de reacción abiertos del fotosistema II ( $F_v/F_m'$ ) en las plantas *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones de riego y secano y medido en diferentes momentos (T0: primavera; T1: principio de verano y T2: finales de verano). Los valores representan la media  $\pm$  SE de tres réplicas ( $n=3$ ).



**Figura 4.2.8.** Medida de Quenching fotoquímico ( $qP$ ) en las plantas *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones de riego y secano y medido en diferentes momentos (T0: primavera; T1: principio de verano y T2: finales de verano). Los valores representan la media  $\pm$  SE de tres réplicas ( $n=3$ ).

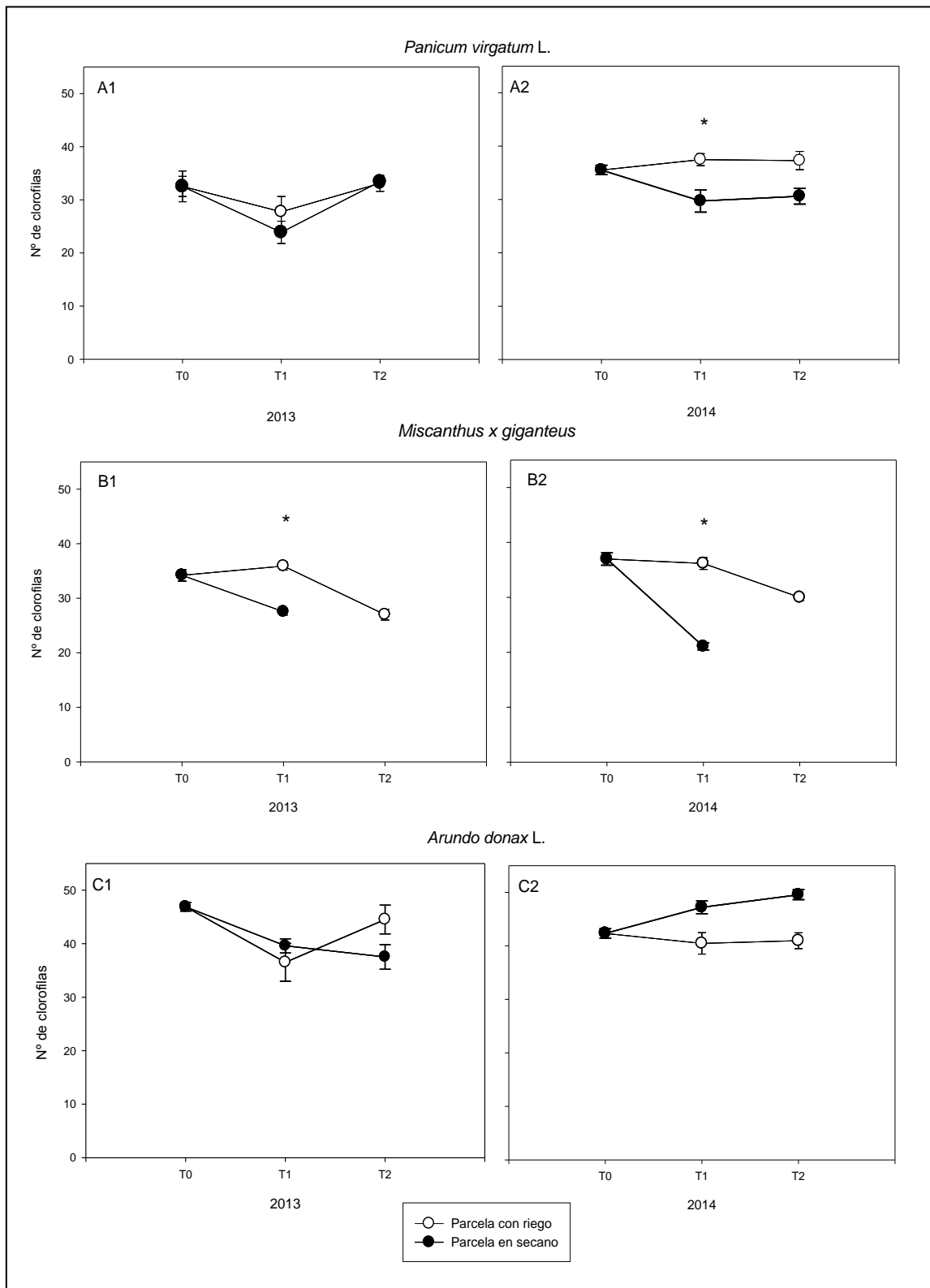
#### 4.2.3.3. Contenido de clorofilas

En primavera al inicio del experimento (T0), la caña común presentó un 30% más de clorofilas en relación con las plantas C4 y entre switchgrass y miscantus hubo diferencias significativas. En condiciones de regadío, switchgrass tuvo una disminución del número de clorofilas en T1 pero luego se recuperó en T2 y no mostro diferencias significativas con el tratamiento de secano. En el año 2014, bajo condiciones de regadío mantuvo el número de clorofilas en los distintos momentos de medición, y en condiciones de secano hubo una disminución del número de clorofilas en T1 respecto a T0 y se mantuvo en T2 (Fig. 4.2.9. A1 y A2). Miscantus en condiciones regadío mantuvo el número de clorofilas entre T0 y T1 pero luego disminuyó en T2. En condiciones de secano, hubo una caída en el nº de clorofilas entre T0 y T1. En T2 no tuvimos datos para este parámetro pues la planta se encontraba senescente al momento de la medición. En 2014, tuvo el mismo comportamiento tanto en condiciones de regadío como en secano, es decir se observaron diferencias entre T0 y T1 donde hubo una disminución en el número de clorofilas y al momento T2 las plantas estaban senescentes (Fig. 4.2.9. B1 y B2). En la caña común podemos observar, que en condiciones regadío, disminuyó el número de clorofilas de T0 a T1 pero luego se recuperó en T2 y en condiciones de secano hubo una disminución a lo largo del tiempo desde T0 a T2. En 2014, hubo mayor contenido de clorofilas en las hojas bajo condiciones de secano que en el regadío, y a su vez en ambos tratamientos este contenido de clorofilas se mantuvo en el tiempo no mostrando diferencias entre T0, T1 y T2 (Fig. 4.2.9. C1 y C2).

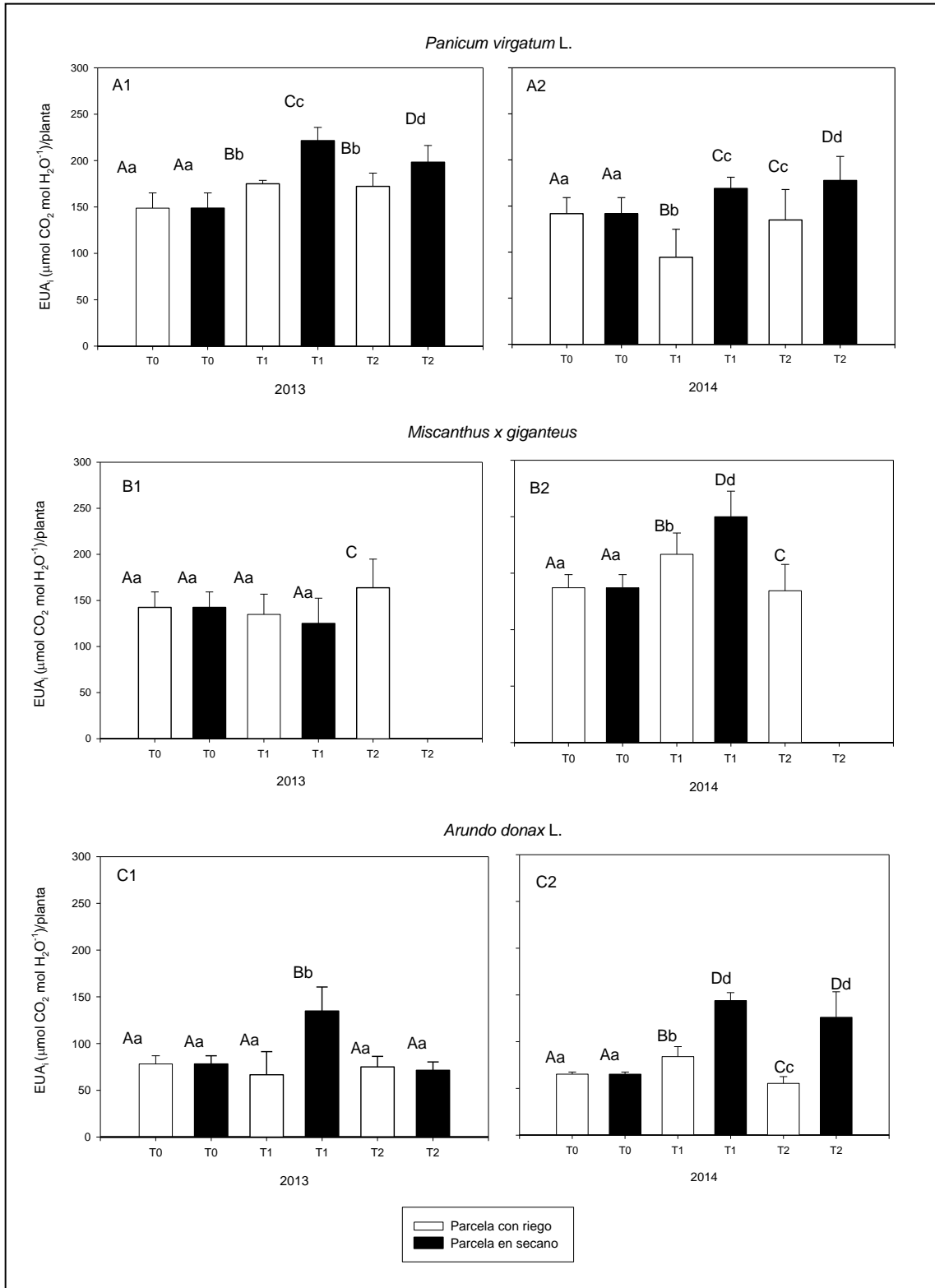
#### 4.2.3.4. Eficiencia del Uso del Agua

A partir de los datos obtenidos de  $A_{sat}$  y  $g_s$  calculamos la eficiencia del uso del agua intrínseca ( $EUA_{intrínseca}$   $\mu\text{molCO}_2 / \text{mol H}_2\text{O}^{-1}$ ). En general, los resultados muestran que las especies C4 tuvieron mayores valores de eficiencia del uso del agua con respecto a la C3 (Fig. 4.2.10). Y a su vez, observamos que bajo condiciones de secano las plantas que fueron más eficientes en el uso del agua. Si comparamos la EUA entre las especies C4, vemos que switchgrass fue más eficiente que miscantus.





**Figura 4.2.9.** Contenido de clorofilas en plantas *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones de riego y seco y tomadas en diferentes momentos (T0: primavera; T1: principio de verano y T2: finales de verano). Los valores representan la media  $\pm$  SE de cuatro réplicas ( $n=4$ ). Asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos para un mismo tiempo de medición.



**Figura 4.2.10.** Eficiencia del Uso del Agua ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ ) en plantas *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones de riego y secano y medida en diferentes momentos (T0: primavera; T1: principio de verano y T2: finales de verano). Los valores representan la media  $\pm$  SE de cuatro réplicas ( $n=4$ ). Dentro de una misma especie y año, letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tiempos para un mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos dentro de un mismo momento de medición.

#### 4.2.3.5. Eficiencia de Uso del Nitrógeno

A nivel general, vemos que la especie que tuvo menor EUN fue la C3 con respecto a las C4 (Tabla 4.2.4). Si observamos el comportamiento de cada especie frente a condiciones de secano vemos que en 2013 switchgrass y la caña común no presentaron diferencias significativas en la EUN entre tratamientos, mientras que miscanthus fue más eficiente en condiciones de secano. En el año 2014, la caña común y miscanthus no mostraron diferencias significativas entre tratamientos pero el switchgrass fue menos eficiente en el uso del nitrógeno en condiciones de secano.

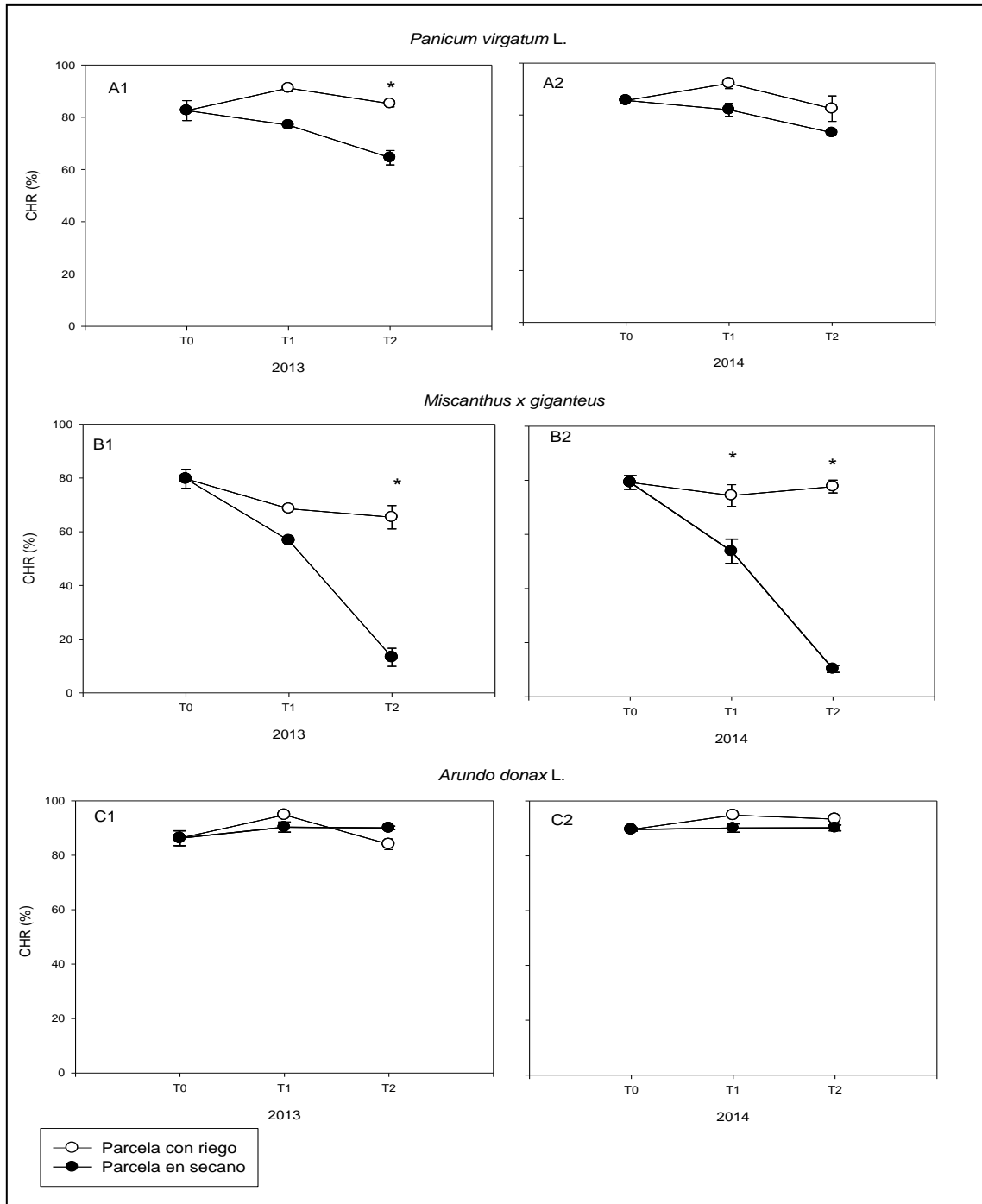
**Tabla 4.2.4.** Eficiencia del uso del Nitrógeno medidos en plantas de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones de riego y de secano durante los años 2013 y 2014. Los valores son las medias  $\pm$  SE de cuatro repeticiones ( $n = 4$ ). Dentro de un mismo año y especie letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos y letras minúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre especies para in mismo año y tratamiento.

| Año  | Parámetros     | Tratamiento | Especies                   |                               |                        |
|------|----------------|-------------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|
|      |                |             | <i>Panicum virgatum</i> L. | <i>Miscanthus x giganteus</i> | <i>Arundo donax</i> L. |
| 2013 | EUN (g PS/g N) | Riego       | 92,02 $\pm$ 8,55Aa         | 75,25 $\pm$ 5,63Ac            | 59,19 $\pm$ 3,45Ac     |
|      |                | Secano      | 80,44 $\pm$ 5,23Aa         | 123,85 $\pm$ 18,00Bb          | 64,50 $\pm$ 4,21Ac     |
| 2014 | EUN (g PS/g N) | Riego       | 151,87 $\pm$ 23,00Aa       | 71,56 $\pm$ 3,50Ab            | 52,39 $\pm$ 8,55Ac     |
|      |                | Secano      | 66,38 $\pm$ 11,00Bb        | 70,20 $\pm$ 4,55Ab            | 56,16 $\pm$ 7,22Ab     |

#### 4.2.3.6. Contenido hídrico relativo (CHR %)

Un alto porcentaje de contenido hídrico relativo (80 %) presentaron las tres especies al comienzo del experimento (T0), el cual fue mantenido a lo largo del experimento en las plantas bajo condiciones de regadío. Mientras que, en condiciones de secano cada especie se comportó de diferente manera. En switchgrass (Fig. 4.2.11 A1) bajo condiciones de secano, solo mostró una disminución del 22% en T2 en 2013 y el mismo comportamiento se observó en 2014 (Fig. 4.2.11 A2) aunque en T2 disminuyó un 15% con respecto a T0. Miscanthus por su lado, mostro una disminución a lo largo del experimento llegando en T2 a un CHR cercano al 10%, y el mismo comportamiento se observó en 2004 (Fig. 4.2.11 B1 y B2). La caña común fue la especie que presentó los mayores porcentajes de contenido relativo de agua (85-95%), no solo mantuvo

estos valores a lo largo del ensayo, sino que no presentó diferencias significativas entre condiciones regadío y seco y además tuvo el mismo comportamiento entre años (Fig. 4.2.11 B1 y 2).

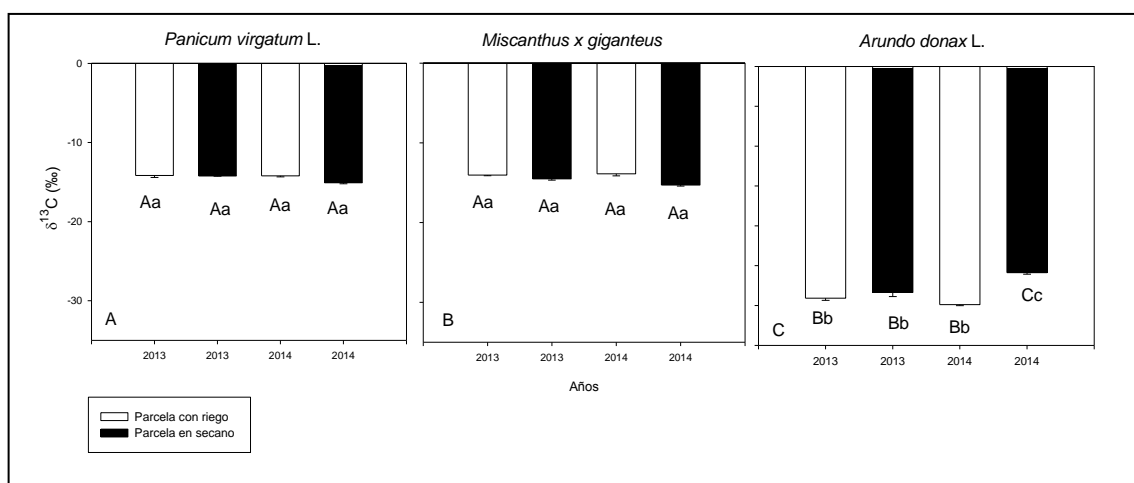


**Figura 4.2.11.** Contenido hídrico relativo en plantas *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones de riego y seco y tomadas en diferentes momentos (T0: primavera; T1: principio de verano y T2: finales de verano). Los valores representan la media  $\pm$  SE de cuatro réplicas ( $n=4$ ). Asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos para un mismo tiempo de medición.

## 4.2.4. Análisis isotópico

### 4.2.4.1 Composición isotópica y discriminación del $^{13}\text{C}$ en la materia orgánica total (MOT)

Los valores de composición isotópica de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$  ‰) en las hojas de cada especie se muestran en la Fig. 4.2.12., en la cual se puede observar que en condiciones regadío, hubo diferencias entre las especies C4 y la C3, donde las plantas C4 tuvieron valores que variaron entre -12 ‰ y -14 ‰ y en la C3 estuvieron entre -27 ‰ y -29 ‰, fueron valores esperados dentro de los rangos de abundancia natural. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos ni entre años en las tres especies, únicamente la caña común en 2014 y bajo condiciones de secano tuvo una composición isotópica diferente (-25 ‰) con respecto al regadío. Esta diferencia de composición isotópica de  $^{13}\text{C}$  se debió a los procesos de discriminación contra el  $^{13}\text{C}$ . En la tabla 4.2.5 observamos que en condiciones regadío hubo una mayor discriminación contra el  $^{13}\text{C}$  en la especie C3 respecto a las plantas C4 y, a su vez, entre éstas dos especies (switchgrass y miscantus) no hubo diferencias significativas. Las especies C4, en condiciones de secano no presentaron diferencias significativas con respecto al regadío y a su vez se comportaron de igual manera durante los dos años de mediciones. Mientras que la caña común en 2014 y en condiciones de secano presentó una menor discriminación respecto al regadío.



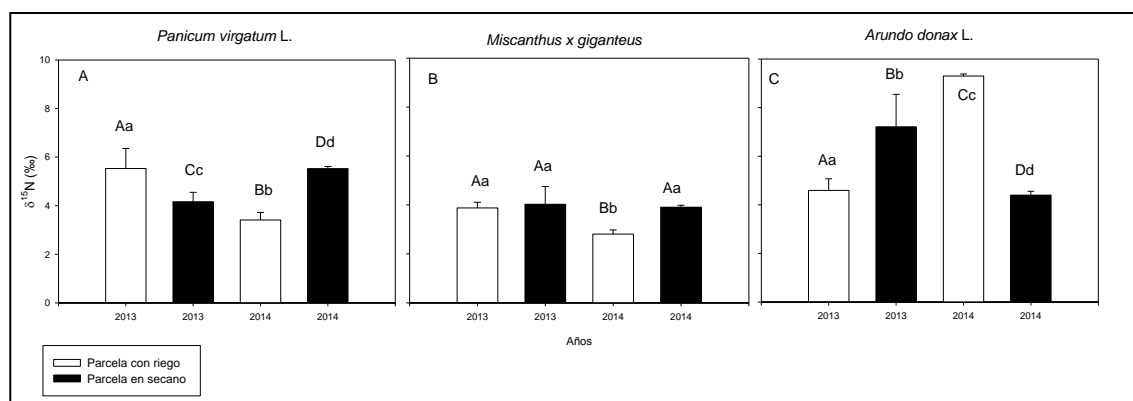
**Figura 4.2.12.** Composición isotópica de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$  ‰) en hojas de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones de riego y secano, durante los años 2013 y 2014. Los valores representan la media  $\pm$  SE de cuatro réplicas ( $n=4$ ). Dentro de una misma especie, letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre años para el mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos.

**Tabla 4.2.5.** Valores de discriminación isotópica del  $^{13}\text{C}$  en hojas de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones de riego y de secano durante los años 2013 y 2014. Los valores son las medias  $\pm$  SE de cuatro repeticiones ( $n = 4$ ). Dentro de un mismo año y especie letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos y letras minúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre especies para in mismo año y tratamiento.

|      |             | Especies                   |                               |                        |
|------|-------------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|
| Año  | Tratamiento | <i>Panicum virgatum</i> L. | <i>Miscanthus x giganteus</i> | <i>Arundo donax</i> L. |
| 2013 | Riego       | 5,69 $\pm$ 0,18Aa          | 5,15 $\pm$ 0,19 Aa            | 20,64 $\pm$ 0,24 Bb    |
|      | Secano      | 5,31 $\pm$ 0,02Aa          | 5,75 $\pm$ 0,19 Aa            | 19,50 $\pm$ 0,51 Bb    |
| 2014 | Riego       | 5,28 $\pm$ 0,22Aa          | 4,91 $\pm$ 0,35 Aa            | 20,88 $\pm$ 1,01 Bb    |
|      | Secano      | 6,12 $\pm$ 0,01Aa          | 6,31 $\pm$ 0,16 Aa            | 16,89 $\pm$ 2,94 Cc    |

#### 4.2.4.2 Composición isotópica de $^{15}\text{N}$ en la materia orgánica total (MOT)

En la figura 4.2.13 se observan los valores de composición isotópica de  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$  ‰) de la hoja para las diferentes especies. En general tuvieron valores positivos mayores al 2‰, siendo en 2014 la caña común la especie con mayor valor de composición isotópica de  $^{15}\text{N}$  en condiciones regadío.



**Figura 4.2.13.** Composición isotópica de  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$  ‰) en hojas de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones de riego y secano, durante los años 2013 y 2014. Los valores representan la media  $\pm$  SE de cuatro réplicas ( $n=4$ ). Dentro de una misma especie, letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre años para el mismo tratamiento y letras minúsculas diferencias ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos.

#### 4.2.4.3 Contenido de C (%) y N (%) y relación C/N en la materia orgánica total (MOT)

Todas las especies presentaron porcentajes de C entre un 38 y 45 % tanto en condiciones regadío como en secano, a excepción de la caña común que en 2013 y bajo condiciones de secano tuvo un 35% de C (Tabla 4.2.6). Si analizamos el contenido de N en la MOT (Tabla 4.2.7) observamos que los porcentajes de nitrógeno fueron mucho menores comparado con el carbono y que hubo un mayor porcentaje en las hojas de la caña común que en las C4. Las relaciones C/N (Tabla 4.2.7) fueron mayores en las especies C4 en relación con la caña común.

**Tabla 4.2.6.** Contenido de Carbono en plantas de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones de riego y de secano durante los años 2013 y 2014. Los valores son las medias  $\pm$  SE de cuatro repeticiones ( $n = 4$ ). Dentro de un mismo año y especie letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos y letras minúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre especies para in mismo año y tratamiento.

|      |             | Especies                   |                               |                        |
|------|-------------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|
| Año  | Tratamiento | <i>Panicum virgatum</i> L. | <i>Miscanthus x giganteus</i> | <i>Arundo donax</i> L. |
| 2013 | Riego       | 43,42 0,37Aa               | 45,86 0,27Aa                  | 40,78 0,97Aa           |
|      | Secano      | 44,06 0,36Aa               | 44,05 0,23Aa                  | 34,91 1,30Bb           |
| 2014 | Riego       | 41,03 0,56Aa               | 40,78 1,07Aa                  | 37,14 0,10Aa           |
|      | Secano      | 43,28 0,52Aa               | 42,19 0,06Aa                  | 38,60 0,08Aa           |

**Tabla 4.2.7.** Contenido de Nitrógeno en plantas de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones de riego y de secano durante los años 2013 y 2014. Los valores son las medias  $\pm$  SE de cuatro repeticiones ( $n = 4$ ). Dentro de un mismo año y especie letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos y letras minúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre especies para un mismo año y tratamiento.

|      |             | Especies                   |                               |                        |
|------|-------------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|
| Año  | Tratamiento | <i>Panicum virgatum</i> L. | <i>Miscanthus x giganteus</i> | <i>Arundo donax</i> L. |
| 2013 | Riego       | 1,09 0,27Aa                | 1,03 0,02Aa                   | 1,45 0,14Cc            |
|      | Secano      | 1,24 0,04Aa                | 0,81 0,12Bb                   | 1,44 0,28Cc            |
| 2014 | Riego       | 0,66 0,01Aa                | 1,40 0,03Bb                   | 1,91 0,01Cc            |
|      | Secano      | 1,51 0,02Bb                | 1,42 0,01Bb                   | 1,78 0,00Cc            |

**Tabla 4.2.8.** Relación C/N en plantas de *Panicum virgatum* L., *Miscanthus x giganteus* y *Arundo donax* L. crecidas en condiciones de riego y de secano durante los años 2013 y 2014. Los valores son las medias  $\pm$  SE de cuatro repeticiones ( $n = 4$ ). Dentro de un mismo año y especie letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos y letras minúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre especies para in mismo año y tratamiento.

|      |             | Especies                   |        |                               |        |                        |        |
|------|-------------|----------------------------|--------|-------------------------------|--------|------------------------|--------|
| Año  | Tratamiento | <i>Panicum virgatum</i> L. |        | <i>Miscanthus x giganteus</i> |        | <i>Arundo donax</i> L. |        |
| 2013 | Riego       | 44,57                      | 2,34Aa | 44,50                         | 0,54Cc | 28,64                  | 2,31Ee |
|      | Secano      | 35,51                      | 1,11Bb | 50,89                         | 3,59Dd | 23,70                  | 1,50Ff |
| 2014 | Riego       | 62,32                      | 0,26Aa | 29,18                         | 0,11Cc | 19,46                  | 0,09Dd |
|      | Secano      | 28,74                      | 0,48Bb | 29,62                         | 0,10Cb | 21,68                  | 0,05Dd |



### **4.3. EXPERIMENTO III: ENSAYOS DE GERMINACIÓN EN *PANICUM VIRGATUM* L.**

#### **4.3.1. Resultados del experimento IIIa: evaluación de diferentes métodos para romper la dormición en la semilla de *Panicum virgatum* L.**

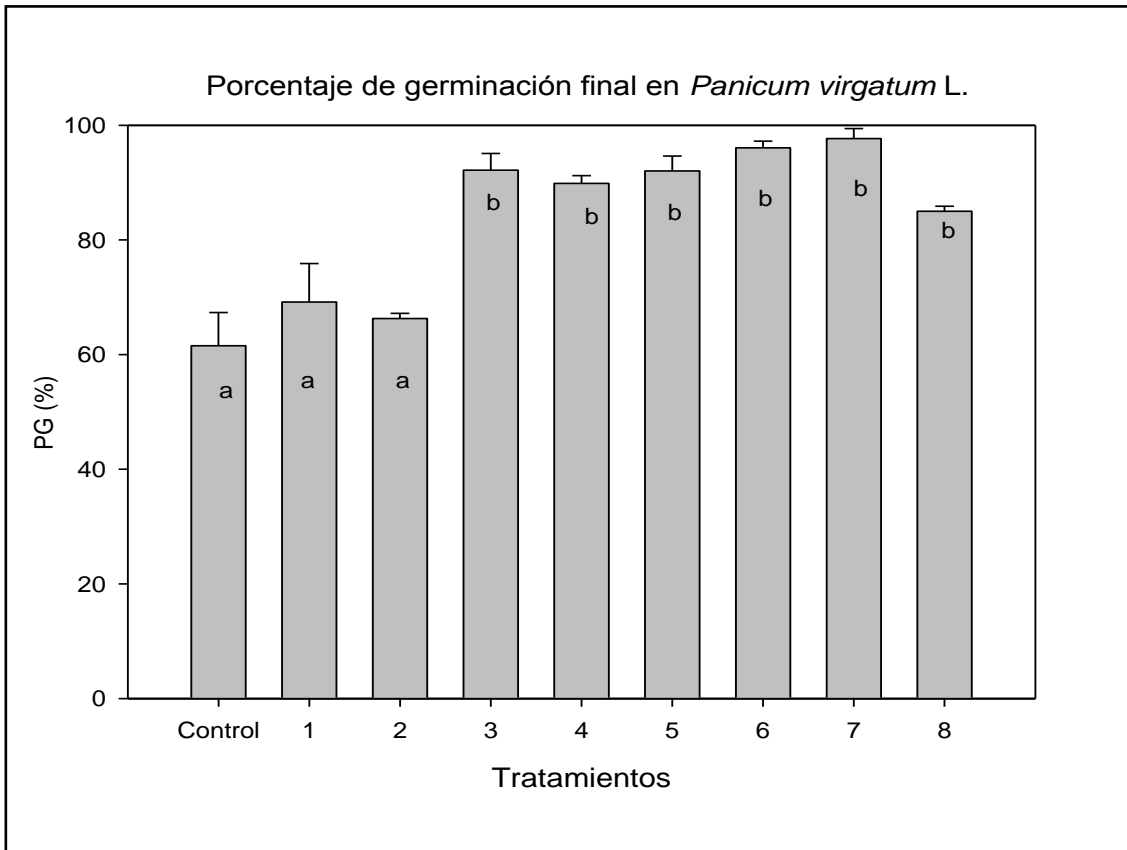
##### **4.3.1.1. Porcentaje de Germinación (PG %) final**

Al final del ensayo, las semillas de la especie *Panicum virgatum* L. en condiciones control presentaron un bajo PG (~ 62%) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos 1 y 2 (priming de 24 y 48h, respectivamente) respecto al control.

Sin embargo, se observó que los tratamientos prechilling per se (4, 6, 8) o en combinación con priming (3, 5) estimularon significativamente la germinación, aumentando entre un 30-36 % el PG con respecto al control, tanto con alternancia 22/16 °C (16 h luz) o 30/15 °C en oscuridad (Fig. 4.3.1).

No hubo diferencias significativas entre los tratamientos donde se combinaron los métodos pre-germinativos: prechilling + priming (3 y 5) y en los que solo se aplicó prechilling (4 y 6). Tampoco se registraron diferencias en los PG en estos mismos tratamientos a los 7 y 14 días.

Se observaron diferencias significativas entre el tratamiento 7 y el control, donde se observó la influencia de la alternancia de temperatura 30°C/15°C en la cámara de germinación. El tratamiento 8, con prechilling de 7 días y alternancia de temperatura 30°C/15°C, pero en condiciones de oscuridad también presentó diferencias con respecto al control.



**Figura 4.3.1.** Efecto de los diferentes métodos pre-germinativos y condiciones en la cámara de germinación sobre el porcentaje de germinación (PG %) final de *Panicum virgatum* L.

Control: No se aplicó ningún método pre-germinativo. Tratamientos: 1- *Priming* de 24h. 2- *Priming* de 48h. 3- Combinado: *Prechilling* 7 días + *Priming*. 4- *Prechilling* 7 días. 5- Combinado: *Prechilling* 14 días + *Priming*. 6- *Prechilling* 14 días. 7- No se aplicó ningún método pre-germinativo pero hubo alternancia de temperatura de 30/15°C en la cámara de germinación. 8- *Prechilling* 7 días, alternancia de temperatura de 30/15°C en la cámara de germinación y en condiciones de oscuridad. Los tratamientos 1, 2, 3, 4, 5, 6 y control se mantuvieron a 22/16 °C en la cámara de germinación. Los valores representan la media  $\pm$  SE de tres réplicas (n=3). Misma letra representa que no fueron diferentes significativamente a 0,05 según el Test de Duncan.

#### 4.3.1.2 Velocidad de germinación

Para cada tratamiento, la velocidad de germinación indicó el tiempo en días en que las semillas llegaron a un porcentaje de germinación del 50% (PG50) y del 75% (PG75) (Tabla 4.3.1).

El control consiguió un PG50 al día 9 del ensayo y no alcanzó el PG75, los tratamientos 1 y 2 obtuvieron un PG50 a los 7 días y tampoco pudieron lograr un PG75. El tratamiento 8, en oscuridad, tuvo un PG50 a los 6 días y un PG75 a los 8 días.

Los tratamientos 3, 4, 5 y 7 alcanzaron el PG50 5 días antes que el control y obtuvieron un PG75 a los tres días después. De todos los tratamientos, el número 6 (*prechilling* de 14 días) obtuvo un

PG75 a los 4 días de ensayo, mientras que los tratamientos 3, 4, 5 y 7 alcanzaron su PG50 a los 4 días y recién a la semana (7 días) lograron el PG75. El tratamiento 8 aceleró la velocidad de germinación con respecto al control pero en menor medida que los anteriores, llegando al PG75 a los 8 días desde que comenzó el ensayo.

Los tratamientos 1 y 2, también presentaron una aceleración de la germinación con respecto al control llegando al PG50 el día 7, pero no consiguieron un PG75.

**Tabla 4.3.1.** Efecto de los diferentes tratamientos pre-germinativos y condiciones en la cámara de germinación sobre el tiempo estimado (días) para alcanzar un PG50 y PG75, según el Test de Kaplan-Meier.

| Tratamientos  | PG 75%       |              | PG 50 %      |              |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|
|   | Día estimado | Error típico | Día estimado | Error típico |
| Control (No se aplicó ningún método pre-germinativo). Alternancia de temperatura 22/16°C en la cámara de germinación. |              |              | 9            | 0,78         |
| 1. Priming de 24h a Temperatura Ambiente. Alternancia de temperatura 22/16°C en la cámara de germinación.             |              |              | 7            | 0,62         |
| 2. Priming de 48h a Temperatura Ambiente. Alternancia de temperatura 22/16°C en la cámara de germinación.             |              |              | 7            | 0,910        |
| 3. Prechilling + Priming de 7 días a 5°C. Alternancia de temperatura 22/16°C en la cámara de germinación.             | 7            | 0,45         | 4            | 0,12         |
| 4. Prechilling de 7 días a 5°C. Alternancia de temperatura 22/16°C en la cámara de germinación.                       | 7            | 0,25         | 4            | 0,19         |
| 5. Prechilling + Priming de 14 días a 5°C. Alternancia de temperatura 22/16°C en la cámara de germinación.            | 7            | 0,43         | 4            | 0,13         |
| 6. Prechilling de 14 días a 5°C. Alternancia de temperatura 22/16°C en la cámara de germinación.                      | 4            | 0,19         | 2            | 0,01         |
| 7. No se aplicó ningún método pre-germinativo. Alternancia de temperatura 30/15°C en la cámara de germinación.        | 7            | 0,21         | 4            | 0,10         |
| 8. Prechilling de 7 días a 5°C. Oscuridad y alternancia de T° 30/15°C en la cámara de germinación.                    | 8            | 0,41         | 6            | 0,33         |

#### 4.3.1.3 Relación entre el PG (%) final y la velocidad de germinación

Hasta el momento se han analizado, por un lado, los resultados de PG final y, por otro, la velocidad en que alcanzaron un PG50 y el PG75 cada tratamiento. Para englobar ambos parámetros y evaluar PG durante todo el período de ensayo se utilizó la regresión de Cox que compara las curvas de supervivencia de cada tratamiento e indica si hay diferencias significativas entre la función de “riesgo” de cada tratamiento y la función de “riesgo” del control.

Cuando se habla de riesgo se hace referencia al “riesgo o situación” que aumenta las probabilidades, en nuestro caso las probabilidades de que una semilla germine en cualquier momento del ensayo respecto al control. Cuanto mayor es el cociente entre el “riesgo” de germinación de un tratamiento respecto al control, mejor será la calidad de germinación.

Según la regresión de Cox, los tratamientos 1 y 2, con priming de 24 y 48 horas, respectivamente, no presentaron diferencias significativas respecto al control (P- valor  $\geq 0,05$ ). Mientras que el resto de los tratamientos presentaron diferencias significativas en la calidad de germinación respecto al control, en un intervalo de confianza del 95% (Tabla 4.3.2).

El tratamiento que presentó una mejor calidad de germinación o un mayor “riesgo relativo” al control (cociente entre riesgos) fue el número 6. Le continuaron el tratamiento el 4 y 7, y en menor medida los tratamientos de prechilling más priming (3 y 5) y el tratamiento 8.

### **4.3.2 Resultados de experimento IIIb: Evaluación de la germinación de *Panicum virgatum* L. en condiciones de salinidad y déficit hídrico**

#### 4.3.2.1 Porcentaje de Germinación (PG %) final en condiciones de estrés salino y déficit hídrico

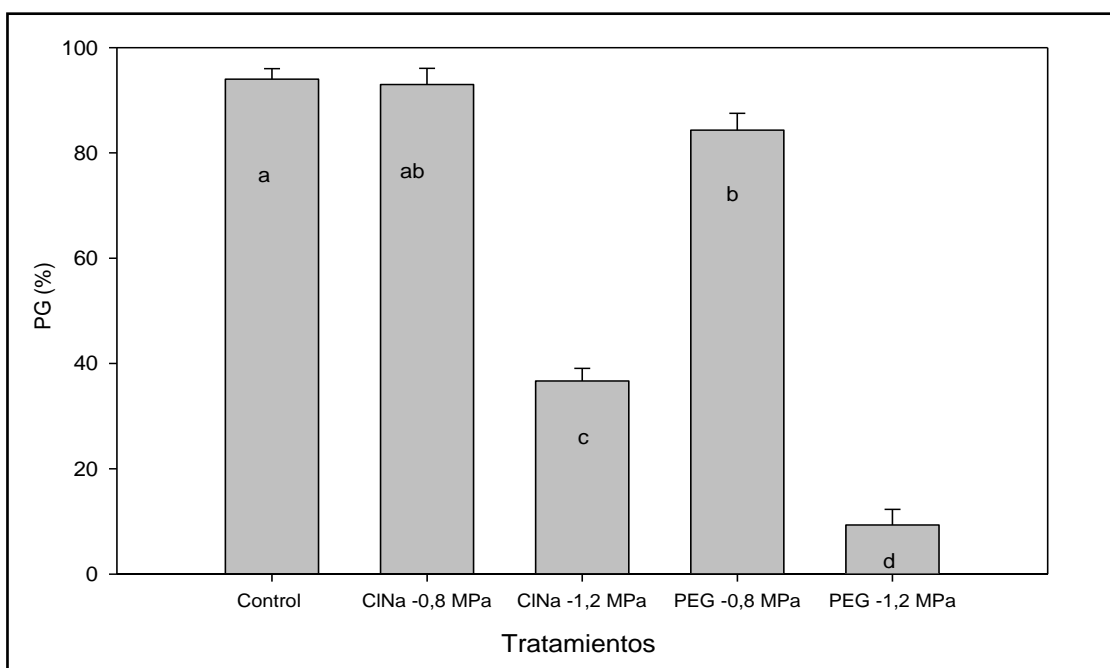
Con el objetivo de evaluar el efecto de los estreses abióticos (salinidad y déficit hídrico) sobre el proceso de germinación de la especie *Panicum virgatum* L., se simularon dos niveles de salinidad con CINA a -0,8 y -1,2 MPa y dos de déficit hídrico con PEG a -0,8 y -1,2 MPa, que fueron comparados con un control (H<sub>2</sub>O destilada).

En general, se observó un efecto negativo sobre el PG (%) en los tratamientos de salinidad y sequía con potenciales hídricos de -1,2 MPa. No se observó diferencias significativas entre el tratamiento de CINA -0,8 MPa y el control, los cuales presentaron un PG al final del ensayo cercano al 94%. En cambio, hubo una disminución del 57% del PG al aumentar el nivel de salinidad a -1,2 MPa. En el tratamiento con PEG -0,8 MPa, el PG fue significativamente menor

en un 10% con respecto al control. Y el tratamiento de PEG -1,2 MPa, fue el más afectado ya que solamente logró obtener un PG final del 9% (Fig. 4.3.2).

**Tabla 4.3.2.** Efecto de los diferentes tratamientos pre-germinativos y condiciones de la cámara de germinación sobre el “riesgo” de germinación en un momento dado de cualquier tratamiento respecto al Control (*Riesgo relativo*), según regresión de Cox.

| Tratamientos   | P-valor | 'Riesgo' relativo al Control | 95% Intervalo de Confianza |          |
|--|---------|------------------------------|----------------------------|----------|
|  |         |                              | Inferior                   | Superior |
| 1. Priming de 24h a Temperatura Ambiente. Alternancia de temperatura 22/16°C en la cámara de germinación.      | 0,13    | 1,24                         | 0,94                       | 1,64     |
| 2. Priming de 48h a Temperatura Ambiente. Alternancia de temperatura 22/16°C en la cámara de germinación.      | 0,36    | 1,14                         | 0,86                       | 1,51     |
| 3. Prechilling + Priming de 7 días a 5°C. Alternancia de temperatura 22/16°C en la cámara de germinación.      | 0,01    | 2,25                         | 1,72                       | 2,94     |
| 4. Prechilling de 7 días a 5°C. Alternancia de temperatura 22/16°C en la cámara de germinación.                | 0,01    | 2,71                         | 2,08                       | 3,55     |
| 5. Prechilling + Priming de 14 días a 5°C. Alternancia de temperatura 22/16°C en la cámara de germinación.     | 0,01    | 2,19                         | 1,66                       | 2,87     |
| 6. Prechilling de 14 días a 5°C. Alternancia de temperatura 22/16°C en la cámara de germinación.               | 0,01    | 3,95                         | 3,04                       | 5,14     |
| 7. No se aplicó ningún método pre-germinativo. Alternancia de temperatura 30/15°C en la cámara de germinación. | 0,01    | 2,38                         | 1,88                       | 3,01     |
| 8. Prechilling de 7 días a 5°C. Oscuridad y alternancia de temperatura 30/15°C en la cámara de germinación.    | 0,01    | 1,57                         | 1,24                       | 1,99     |



**Figura 4.3.2.** Efecto de los tratamientos de salinidad: CINA -0,8 y -1,2 MPa, y déficit hídrico: PEG -0,8 -1,2 MPa, sobre el porcentajes de germinación (PG %) final en *Panicum virgatum* L. Todos los tratamientos fueron sometidos a un *Prechilling* de 5°C por 7 días y la germinación tuvo lugar en la cámara de germinación alternancia de temperatura de 30/15°C (según lo recomendado por ISTA, 2012). Los valores representan la media  $\pm$  SE de tres repeticiones. Misma letra representa que no fueron diferentes significativamente a 0,05 según el Test de Duncan.

#### 4.3.2.2 Velocidad de germinación

El tiempo en el que las semillas fueron germinando se vio afectada por el estrés impuesto (Tabla 4.3.3), los tratamientos con potenciales hídricos de -1,2 MPa no consiguieron alcanzar un PG50.

En condiciones control, las semillas alcanzaron un PG50 al segundo día de ensayo y un PG75 al cuarto día, mientras que el tratamiento con CINA a -0,8 MPa logró un PG50 8 días después que el control y el PG75 a los 10 días después. Las semillas con PEG -0,8 MPa obtuvieron un PG50 a los 14 días y recién a los 26 días lograron un PG75.

#### 4.3.2.3. Relación entre PG (%) final y la Velocidad de germinación

La regresión de Cox reflejó una disminución significativa en la calidad de germinación (Tabla 4.3.4). El tratamiento CINA -0,8 MPa tuvo mejor calidad de germinación que PEG -0,8 MPa. Y los tratamientos CINA y PEG a -1,2 MPa, no presentaron una buena calidad de germinación, ya que tuvieron un valor de riesgo relativo menor respecto al control.

**Tabla 4.3.3.** Efecto de los diferentes tratamientos de salinidad y déficit hídrico sobre el tiempo estimado (días) para alcanzar un PG50 y PG75, según el Test de Kaplan-Meier.

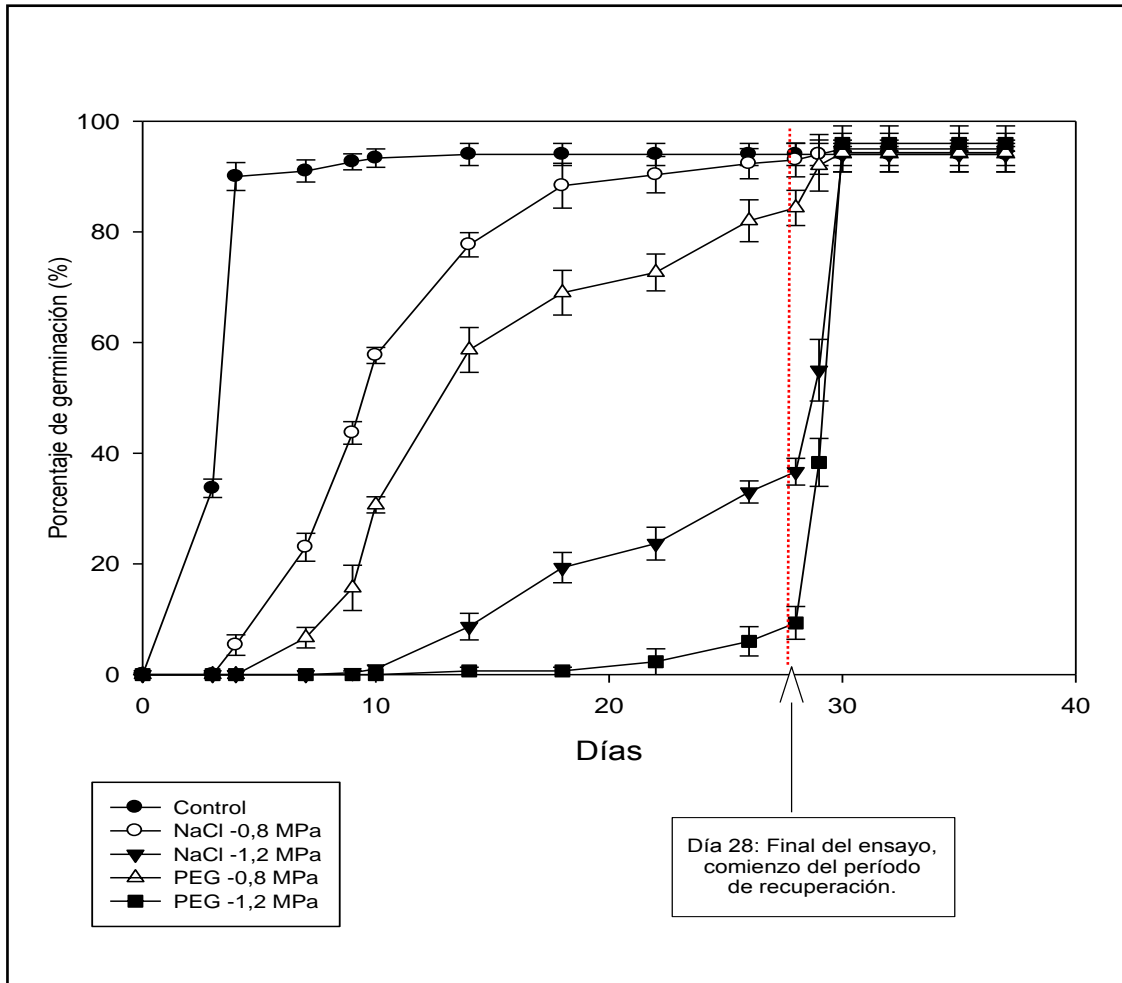
| Tratamientos  | PG 75 %      |              | PG 50 %      |              |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|               | Día estimado | Error típico | Día estimado | Error típico |
| Control       | 4            | 0,03         | 2            | 0,03         |
| CINa -0,8 MPa | 14           | 0,62         | 10           | 0,20         |
| PEG -0,8 MPa  | 26           | 1,36         | 14           | 0,40         |

**Tabla 4.3.4.** Efecto de los tratamientos de salinidad y déficit hídrico sobre el “riesgo” de germinación en un momento dado de cualquier tratamiento respecto al Control (*Riesgo relativo*), según regresión de Cox.

| Tratamientos  | P-valor | “Riesgo relativo” al control | 95,0% IC |          |
|---------------|---------|------------------------------|----------|----------|
|               |         |                              | Inferior | Superior |
| CINa -0,8 MPa | 0,01    | 0,33                         | 0,281    | 0,399    |
| CINa -1,2 MPa | 0,01    | 0,06                         | 0,047    | 0,075    |
| PEG -0,8 MPa  | 0,01    | 0,21                         | 0,177    | 0,254    |
| PEG -1,2 MPa  | 0,01    | 0,01                         | 0,009    | 0,021    |

#### 4.3.2.4. Porcentaje de germinación de semillas recuperadas

Luego de 7 días en recuperación, se observó que los PG incrementaron (Fig. 4.3.3), alcanzando valores cercanos o iguales al control. Así, en el tratamiento CINa -1,2 MPa la recuperación fue de un 57%, pasando de un PG de 37% a 94% en dos días de recuperación. Para el PEG -0,8 MPa la recuperación fue tan sólo de un 10%, ya que al día 28 de experimento ya tenía un 84% de semillas germinadas y pasó a un 94% en dos días de recuperación. Mientras que el PEG -1,2 MPa fue el tratamiento que más se recuperó, con un 83% de recuperación de semillas germinadas, pasando de un 9% a un 96% de PG en dos días.



**Figura 4.3.3.** Porcentaje acumulado de germinación a lo largo de 28 días de ensayo. La flecha indica el día 28 donde comenzó el período de recuperación para las semillas de los tratamientos: CINA -1,2 MPa; PEG -0,8 y -1,2 MPa, que no habían germinado hasta el momento.

#### 4.3.2.5. Longitud de la radícula

Se tomaron medidas de longitud de la radícula, bajo condiciones de estrés abiótico (salinidad y déficit hídrico), a los 10 y 20 días desde el inicio del experimento de germinación (Tabla 4.3.5).

A los 10 días, la longitud media de 15 radículas en condiciones control fue de  $13 \pm 0,91$  mm, con CINA y PEG a -0,8 MPa la elongación fue significativamente inferior con respecto al control y entre ellas. Mientras que, no se obtuvieron resultados para los tratamientos a -1,2 MPa porque no habían germinado hasta ese momento del ensayo.

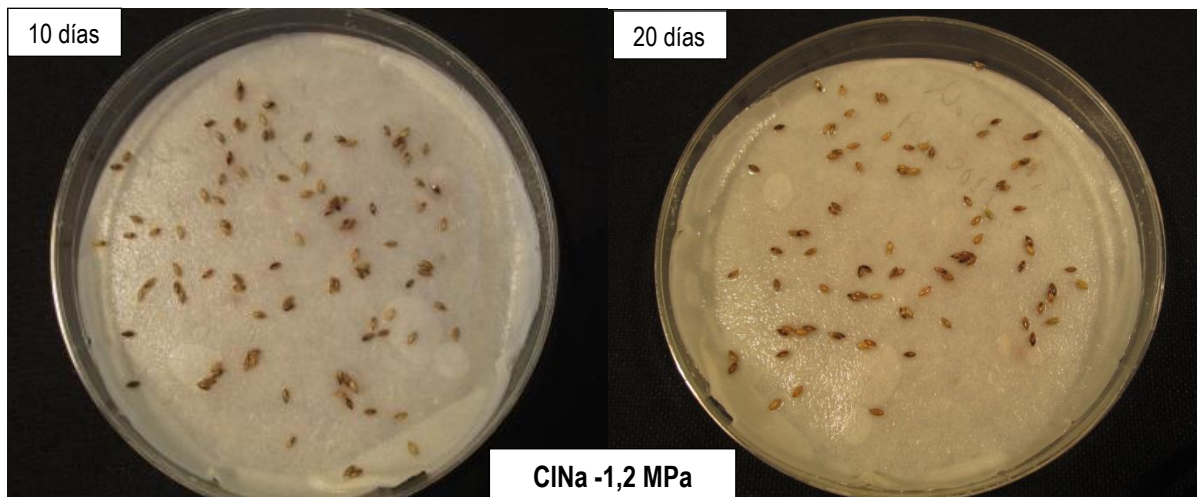
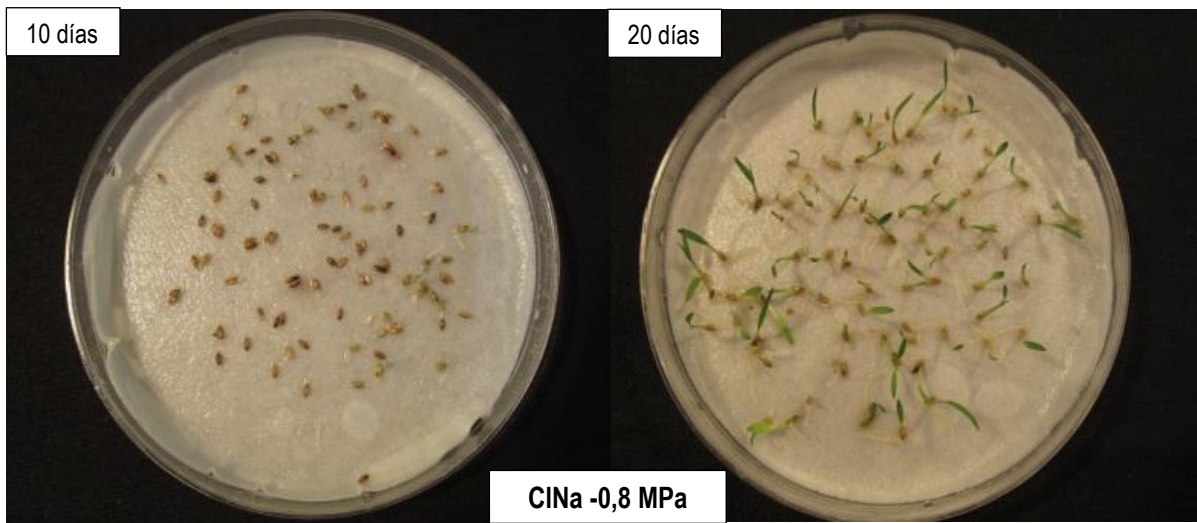
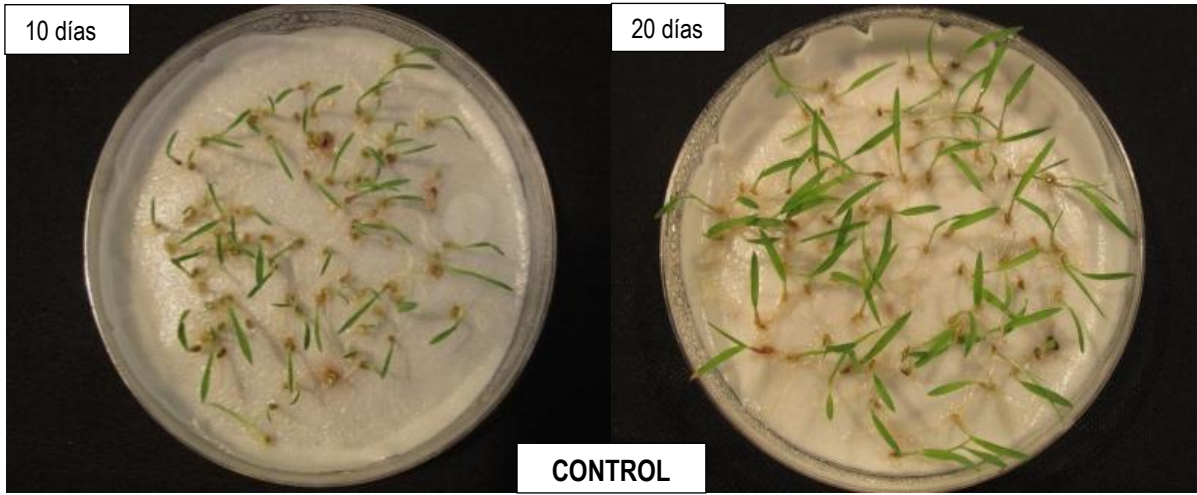
A los 20 días de ensayo, las radículas en condiciones control se alargaron un 28,0 % más con respecto al día 10, el tratamiento con CINA -0,8 MPa creció 3 mm respecto al día 10 pero sólo creció un 16 % en relación al control. Con PEG -0,8 MPa creció 2 mm respecto al día 10 y un 11

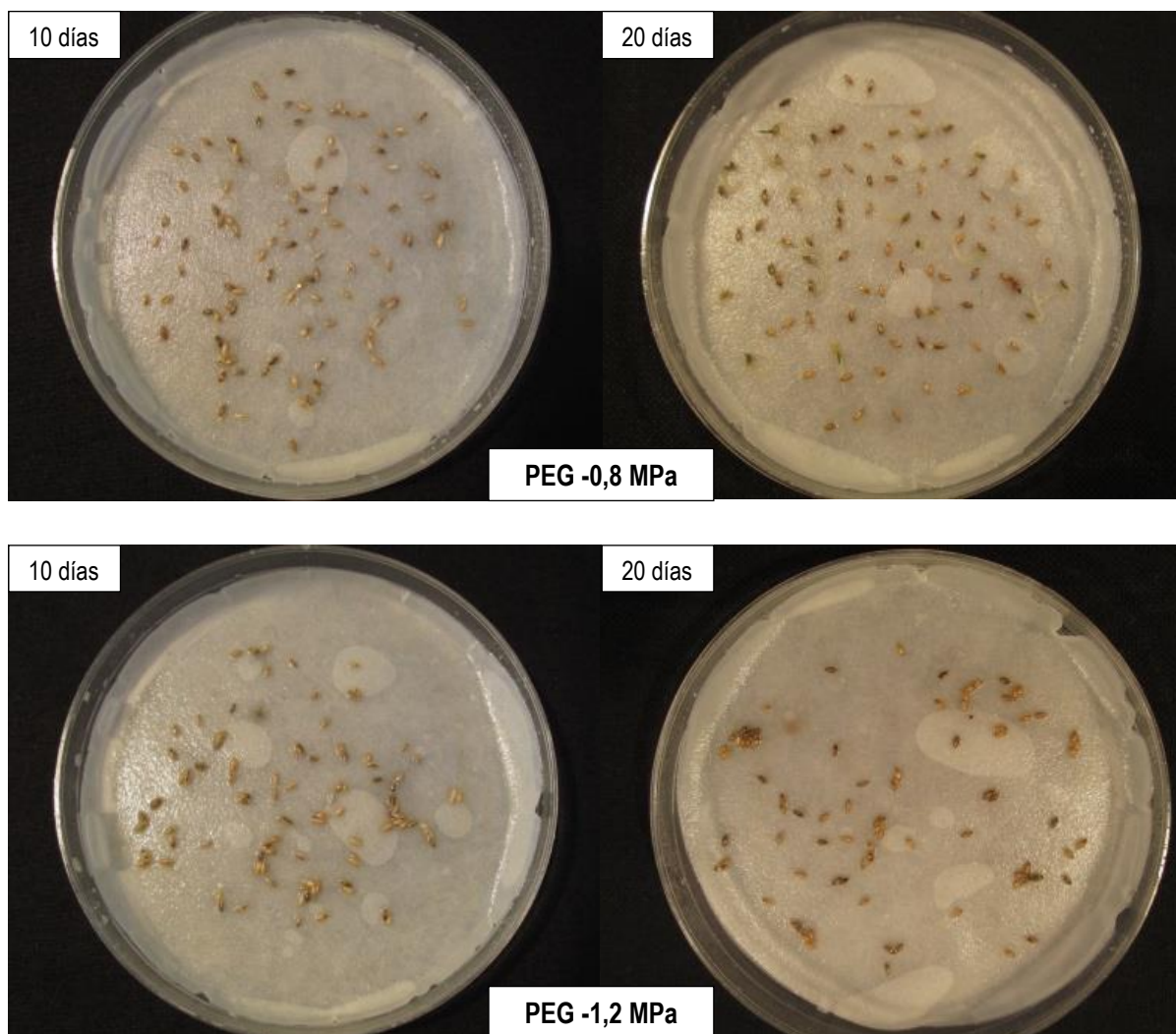


% respecto al control. El tratamiento CIna -1,2 MPa recién presento al día 20 semillas con radículas de 3 mm de longitud. Y no se obtuvieron resultados para el tratamiento con PEG -1,2 MPa, ya que no se observó un número significativo de radículas emergidas hasta el día 20 (Fig. 4.3.3).

**Tabla 4.3.5.** Efecto de los tratamientos de CIna y déficit hídrico sobre la elongación (mm) medido a los 10 y 20 días de germinado. Efecto de los tratamientos de CIna y déficit hídrico sobre la sección transversal de la radícula y grosor de la endodermis a los 20 días de germinado. Los valores representan la media  $\pm$  SE de tres réplicas (n=3), misma letra, en la misma columna, representa que no fueron diferentes significativamente a 0,05 según el Test de Duncan.

| Tratamientos  | Longitud de radícula (mm) |                        | Área de la sección transversal ( $\mu\text{m}^2$ ) | Grosor de la endodermis ( $\mu\text{m}$ ) |
|---------------|---------------------------|------------------------|--|---|
|               | 10 días de germinación    | 20 días de germinación | 20 días de germinación                             |   |
| Control       | 13 $\pm$ 0,91d            | 18 $\pm$ 1,50e         | 41151,33 $\pm$ 1491,98c                            | 713,80 $\pm$ 73,04a                       |
| CIna -0,8 MPa | 5 $\pm$ 0,31c             | 8 $\pm$ 0,50d          | 27547,00 $\pm$ 768,80b                             | 1686,00 $\pm$ 100,65b                     |
| CIna -1,2 MPa | 0 $\pm$ 0,00a             | 3 $\pm$ 0,00b          | nd   | nd  |
| PEG -0,8 MPa  | 3 $\pm$ 0,31b             | 5 $\pm$ 0,77c          | 17397,41 $\pm$ 574,92a                             | 1523,80 $\pm$ 101,92b                     |
| PEG -1,2 MPa  | 0 $\pm$ 0,00a             | 0 $\pm$ 0,00a          | nd   | nd  |





**Figura 4.3.4.** Efecto de los tratamientos de CINA y PEG a -0,8 y -1,2 MPa sobre germinación y crecimiento de las plántulas de *Panicum virgatum* L. a los 10 y 20 días de ensayo.

#### 4.3.2.6 Anatomía de la radícula emergida

El área total de la sección transversal de la radícula disminuyó un 33 % con el tratamiento de CINA -0,8 MPa y un 58 % con el PEG -0,8 MPa con respecto al control, mostrando diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 4.3.5).

A nivel anatómico, los cortes transversales de la radícula, presentan una estructura típica de monocotiledóneas, donde distinguir desde la periferia hacia el centro: la rizodermis, la corteza y el cilindro central y/o vascular.

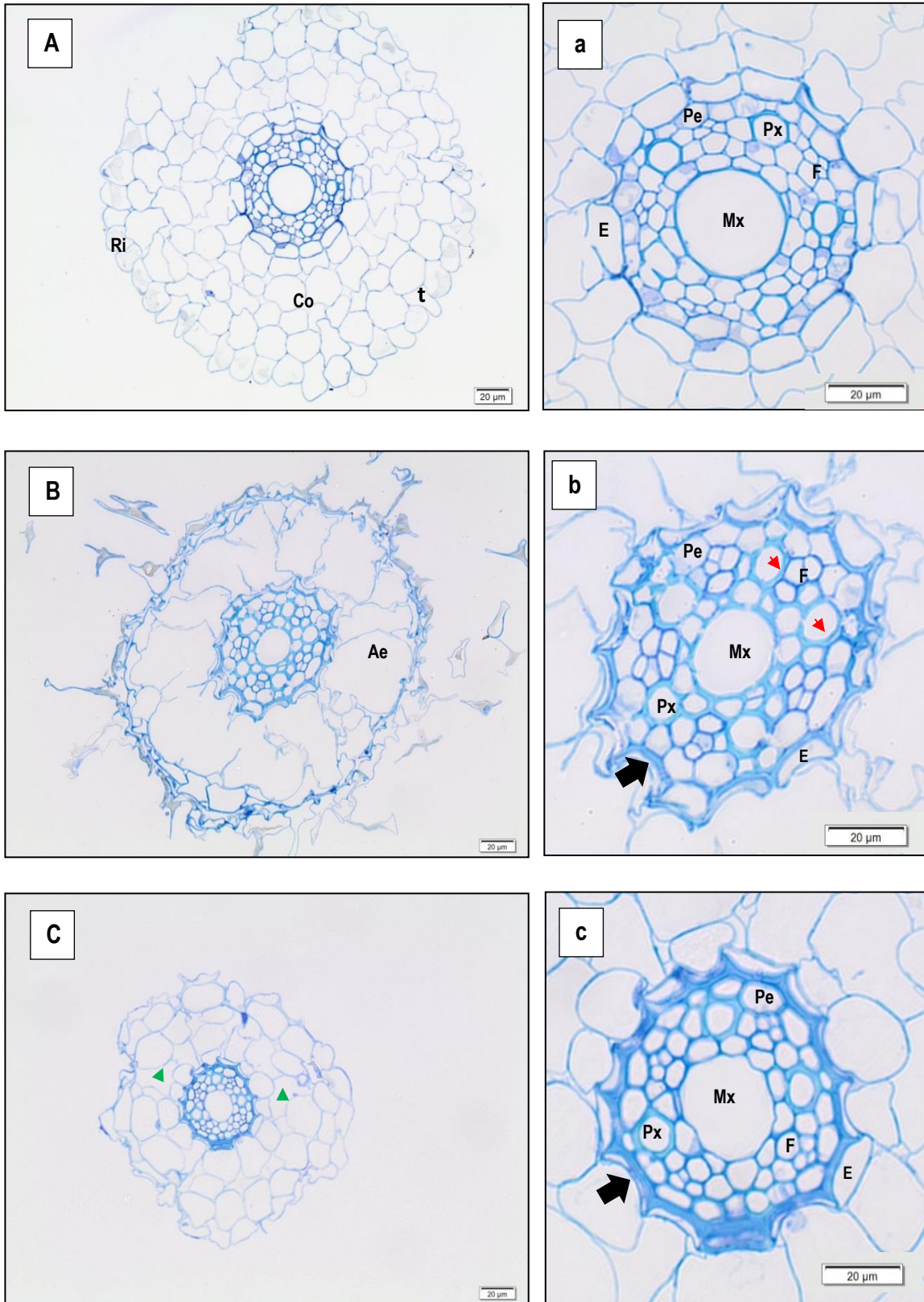
En el control, observamos una rizodermis uniestratificada, con células epidérmicas propiamente dichas o fundamentales, isodiamétricas de paredes delgadas y carentes de cutícula; también presenta numerosos tricoblastos. La corteza, comprende 5 estratos de células parenquimáticas (4 de parénquima cortical más una de la endodermis) poliédricas, de paredes finas y con abundantes espacios intercelulares. No se diferencia una exodermis debajo de la rizodermis, pero si observamos una endodermis formada por una capa de células y con presencia de la banda de Caspary. En el cilindro central o vascular (Fig. 4.3.5a), distinguimos el periciclo uniestratificado y con divisiones periclinales frente a los polos del protoxilema. La raíz es poliarca (5 polos), donde el xilema y floema, de paredes delgadas, se disponen en cordones alternos. El floema se ubica próximo al periciclo y no se extiende hacia el centro. Los miembros de vaso del protoxilema, se extienden desde el periciclo hacia el centro de la radícula, donde se diferencia un miembro de vaso del metaxilema que ocupa el lugar de la médula parenquimática (Fig. A y a). Se observaron cambios a nivel anatómico según el estrés impuesto en cada tratamiento:

En el tratamiento de salinidad (CINa -0,8 MPa), observamos en la corteza la formación de cavidades aerenquimáticas y las paredes de la endodermis presentan un marcado engrosamiento (estadio terciario) comparado con el control (Tabla 4.3.6). En el cilindro central o vascular, se puede observar que las paredes de los miembros de vaso, de meta y protoxilema, están más engrosadas en comparación con el control (Fig. B y b).

En el tratamiento de con PEG (-0,8 MPa), la corteza presenta de células parenquimáticas, poliédricas, de paredes finas y con abundantes espacios intercelulares y una endodermis con un marcado engrosamiento comparado con el control (Tabla 4.3.5). En el cilindro central, también se puede observar que las paredes de los miembros de vaso, de meta y protoxilema, están más engrosadas en comparación con el control (Fig. C y c).

No se consiguieron datos de análisis anatómicos para el tratamiento CINa -1,2 MPa, porque al día 20 del ensayo la longitud de radícula fue muy reducida, que dificulta su manipulación al momento de preparación de la muestra. Lo mismo para el tratamiento PEG -1,2 MPa, en el cual no hubo emergencia de la radícula hasta el día 20, como podemos observar en la Fig. 4.3.4.





**Figura. 4.3.5.** Corte transversal de la radícula de *Panicum virgatum* L. **A**, Control; **B**, Tratamiento con CINa -0.8 MPa y **C**, Tratamiento con PEG -0.8 MPa. **a**, **b** y **c** detalle del cilindro central correspondiente a cada tratamiento. **Ri**, rizodermis; **t**, tricoblasto; **Co**, corteza; **Ae**, aerénquima; **E**, endodermis; **Pe**, periciclo; **F**, floema; **Mx**, metaxilema y **Px**, protoxilema. Flechas rojas indican engrosamiento de las paredes de los miembros de vaso, flechas verdes espacios grandes intercelulares y flechas negras indican engrosamiento de las paredes de la endodermis.

## 5. *Discusión*



## 5.1. EXPERIMENTO I: CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS TRES ESPECIES EN AMBIENTE CONTROLADO

Con el fin de realizar la caracterización fisiológica de estas tres gramíneas perennes se planteó el Experimento I, el cual se llevó a cabo en ambiente controlado y bajo condiciones óptimas de crecimiento. El estudio de parámetros de crecimiento y fisiológicos (intercambio de gases, fluorescencia y uso de isótopos estables) nos aportó un enfoque integrador, que ayudó a interpretar la morfología y funcionamiento de las plantas; ya que la materia seca como producto final representa la capacidad que tiene cada especie para utilizar con eficiencia los recursos y sintetizar biomasa (Heggenstaller and Liebman, 2009).

### 5.1.1. Medidas de crecimiento

Algunas de las características agronómicas más deseables en cultivos candidatos para biocombustibles es que posean altas tasas de crecimiento relativo acompañado de una alta productividad de materia seca (Barney *et al.*, 2009). La tasa de crecimiento relativo (TCR), definida como el incremento de biomasa por unidad de tiempo (Poorter and Remkes, 1990), durante los primeros estadios de una planta en crecimiento suele tener una dinámica exponencial y puede reflejar diferencias significativas entre especies. Sin embargo, en nuestro estudio, no hubo diferencia en las TCR entre las tres especies que expresaron una alta ganancia de PS por unidad de biomasa y tiempo, cuyos valores estuvieron dentro del rango de valores característicos de plantas herbáceas de crecimiento rápido (100 - 400 mg g<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, Poorter *et al.* 1990). A nivel de producción de biomasa, la especie C3 “caña común” fue la que presentó mayor productividad en comparación con switchgrass y miscantus, coincidiendo con resultados obtenidos por Lewandowski *et al.* (2003), Angelini *et al.* (2009), Nassi *et al.* (2011); entre otros. A su vez, si comparamos la productividad de la biomasa entre las dos especies C4, observamos que, aunque ambas especies muestren similitudes a nivel fisiológico y fenológico incluyendo una alta EUA (Hickman *et al.*, 2010), miscantus tuvo mayor productividad que switchgrass debido a su mayor área foliar (Fig. 4.1.2 B), como mostraron Heaton *et al.* (2004); Burner *et al.* (2009), Lasorella *et al.* (2011) y Vanloocke *et al.* (2012).

En general, las plantas tienen un patrón de distribución de la biomasa intrínseco y son capaces de modificarlo para optimizar la captura de los recursos en el entorno en que se encuentran. La asimilación y distribución de materia seca dentro de la planta, son procesos importantes que determinan la productividad del cultivo (Tekalign and Hammes, 2005a; Núñez *et al.*, 2009). Es



decir, las plantas distribuyen los fotoasimilados y nutrientes que incorporan a los diferentes compartimentos (hojas, tallo, raíz y el rizoma) y estos recursos pueden ser asignados directamente al crecimiento vegetativo/reproductivo o se pueden almacenar. Miscantus fue la especie que presentó mayores valores de AF, AFE, RAF y IAF en comparación con switchgrass y caña común. El mayor valor de AFE se debió a que produjo una gran cantidad de hojas por planta pero estas hojas fueron de poco PS. La caña común por el contrario, tuvo un bajo valor de AFE, ya que produce menos cantidad hojas por planta pero estas son más gruesas y, por tanto, tiene un mayor PS (g).

En general, el PS del sistema radicular en las tres especies fue mayor que el PS de la parte aérea, por lo que los valores de la relación entre el peso seco de las hojas con respecto al peso seco de la planta entera ( $\text{kg kg}^{-1}$ ) fueron muy bajos. Esto se podría traducir que las plantas invirtieron más en el desarrollo del sistema subterráneo (raíz + rizomas). La proporción de biomasa invertida para la formación de hojas (RPF) fue mayor en switchgrass y menor en caña común y miscantus. Estos bajos valores, obtenidos por caña común y miscantus, responden a que el peso seco de su sistema subterráneo (raíz + rizomas) fue mucho mayor que el peso seco de su parte aérea, lo que indicaría que estas especies destinaron más recursos para abastecer el crecimiento de raíces y rizomas. Otro indicador que confirma lo mencionado anteriormente sobre la distribución del peso seco en la planta entera es el cociente Root/Shoot. Así, miscantus tuvo un mayor cociente R/S lo que representa que el 82% del PS fue destinado a la parte subterránea y sólo el 17% a la PA. Después le sigue la caña común con el 67% de PS en la parte subterránea y el 32% PA y, finalmente, switchgrass tuvo una distribución más equilibrada con 55% de PS en su sistema radicular y el 44% en PA. El hecho de que estas especies desarrollen grandes sistemas subterráneos es otro de los rasgos buscados en especies candidatas para biocombustibles, ya que esto implicaría una mayor prevención de la erosión del suelo, favorecer la captura de carbono o aumentar carbono en el suelo (Lewandowski *et al.*, 2003; Heaton 2004; Dondini *et al.*, 2009; Skinner and Adler, 2010). Además incrementaría la capacidad de utilizar agua y nutrientes de suelos más profundos (McLaughlin and Kszos, 2005).

El mayor índice de área foliar (IAF) en miscantus coincide con resultados obtenidos por Nassi *et al.* (2011), y se debe a que esta especie produjo una gran cantidad de tallos delgados con hojas por unidad de superficie de suelo ( $\text{cm}^2$ ), mientras que el menor IAF en la caña común se debe a que produce menos cantidad de tallos y menos número de hojas (Fig. 4.1.2 B). Si relacionamos el área foliar con el peso seco total de la planta (RAF), las especies C4 tuvieron mayor valor que la C3. Este menor valor de RAF obtenido por la caña común se interpreta como una mayor

eficiencia fotosintética para lograr una mayor producción de biomasa por planta con una menor superficie foliar (AF) que en switchgrass y miscantus. Por otro lado, la caña común presentó valores muy superiores de cociente entre el peso seco foliar y el área foliar (AMF  $\text{gm}^{-2}$ ) comparado con las especies C4, lo cual fue debido principalmente a su mayor peso seco foliar. Este parámetro tiene una gran importancia a nivel de intercepción de luz y crecimiento de las plantas (Poorter *et al.*, 2009), ya que la hoja es un órgano fotosintético y, como tal, contiene un gran número de cloroplastos en el mesófilo (Lambers and Poorter, 1992) y podría ser un indicador importante de estrategias de la planta (Grime, 2001; Westoby *et al.*, 2002). La AMF también puede ser explicada por la variación a nivel anatómico, ya que un mayor volumen de mesófilo por unidad de área foliar representa una menor densidad ( $\text{g cm}^3$ ) de la hoja, lo cual podría ser causada por la presencia de un mayor volumen de espacios de aire. Este rasgo mejoraría la conductividad dentro de la hoja y facilitaría el proceso de fotosíntesis (Niinemets, 1999).

### 5.1.2. Medidas de fisiológicas

En condiciones hídricas adecuadas, la tasa fotosintética de las plantas alcanza su valor máximo cuando se combinan condiciones óptimas de  $\text{CO}_2$ , luz y temperatura (Azcón y Talón, 2008). Nuestros resultados reflejan la variabilidad que existe en la capacidad fotosintética cuando comparamos diferentes especies. Generalmente, las especies que usan la vía fotosintética C4, se caracterizan por ser más eficientes en el uso de agua, de nutrientes y, sobre todo, por su mayor capacidad de asimilación de  $\text{CO}_2$ , debido a los mecanismo de concentración de  $\text{CO}_2$  en la célula de la vaina del haz y la inhibición de la fotorrespiración (Hatch, 1987; Long, 1994; Zhu *et al.*, 2007). Todas estas características se coordinan para ofrecer altas tasas de fotosíntesis (Warner *et al.*, 1987; Beale and Long, 1995; Pinto *et al.*, 2014), que se traducen en una mayor productividad de las plantas C4 frente a las plantas C3. Sin embargo en este trabajo, cuando comparamos las tasas de asimilación de  $\text{CO}_2$  entre especies C3 y C4, observamos que la especie C3 caña común presentó una tasa de asimilación superior a las dos especies C4 (Tabla 4.1.1) coincidiendo con resultados obtenidos por Rossa *et al.* (1998), Papazoglou *et al.* (2005), Ceotto *et al.* (2013) y Nackley *et al.* (2014) quienes destacan que la “caña común” es una especie C3 con una inusual alta capacidad fotosintética.

Los parámetros calculados a partir de la curva  $A/c_i$  fueron superiores en caña común, lo cual era esperable ya que mantener altas tasas de asimilación es necesario una mayor velocidad de

carboxilación ( $V_{c, max}$ ) para fijar el  $CO_2$  que se va incorporando y a su vez una mayor tasa de transporte de electrones ( $J_{max}$ ) para regeneración de la RuBP (Taiz y Zeiger, 2010).

Como bien se sabe, la fotosíntesis es linealmente dependiente del contenido de N en la hoja (Bolton and Brown, 1980), sobre todo en las especies C3, donde aproximadamente el 40% del nitrógeno foliar es invertido para la síntesis de la enzima Rubisco (Sage *et al.*, 1987a). Nuestros datos coinciden con estos autores, ya que hubo un mayor contenido de N en la hoja de la caña común comparado con las especies C4 (Tabla 4.1.8), debido a la mayor demanda de N para mantener el pool enzimático. Una mayor tasa de respiración por consumo de  $O_2$  en la caña común respecto a las especies C4 (Fig. 4.1.8), también sugiere una mayor actividad metabólica. Altas tasas de asimilación de  $CO_2$  implica una mayor demanda de energía y síntesis de NADPH y ATP generada en mitocondria (Byrd *et al.*, 1992; Cousins and Bloom, 2004, Azcón y Talón, 2008).

En cuanto al uso del agua, ambas especies C4 presentaron una mayor EUA en comparación con la caña común (Tabla 4.1.7). Esta mayor EUA fue resultado de una menor conductancia estomática, característico de las C4, que les da una mayor capacidad de regular la pérdida de agua por transpiración (Ghannoun Oula, 2009; Skinner and Adler, 2010; Hickman 2010). El mismo contenido de C (%) en la MOT en las tres especies, pero un mayor contenido de N en la MOT de caña común (Tablas 4.1.7 y 4.1.8) confirma la mayor EUN en las plantas C4 (Sage and Pearcy, 1987; Sage, 2004), ya que para producir la misma cantidad de carbono las C4 necesitan menos N (Tabla 4.1.2). Esta característica de las C4, es debida a su capacidad de concentrar  $CO_2$  cerca de los sitios de carboxilación y así alcanzar mayores tasas fotosintéticas (Ehleringer and Monson, 1993). Por otro lado, invierten menos N en las hojas para la formación de Rubisco a diferencia las C3 (Tabla 4.1.8), lo cual se traduce en un menor gasto energético tanto para translocación del N hasta la hoja como para la síntesis de compuestos orgánicos nitrogenados en la raíz (Taiz y Zeiger, 2010).

En las plantas C4 existen tres vías fotosintéticas diferentes que difieren en los mecanismos utilizados para el transporte de  $CO_2$  hacia las células de la vaina y la enzima de descarboxilación para regenerar fosfoenol piruvato (PEP). Estos subtipos son denominados: NAD-ME (la enzima NAD-málico es responsable de la descarboxilación y es dependiente de NAD mitocondrial), NADP-ME (el oxalacetato se reduce a malato y posteriormente es descarboxilado en el cloroplasto de las células de la vaina por la enzima NADP-málico) y PCK (la descarboxilación está catalizada por la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa) (Hatch, 1987). De estos subtipos, NAD-ME y NADP-ME son los más comunes y tienen la más amplia distribución

taxonómica, las cuales están representados en este estudio por la especie switchgrass y miscantus, respectivamente (Naidu and Long, 2004). Bowman (1991) y LeCain and Morgan (1998) han planteado la hipótesis de la diferencia entre subtipos, donde las especies NADP-ME como miscantus tendrían una mayor tasa de fotosíntesis y superiores concentraciones de nitrógeno en sus órganos fotosintéticos en comparación a las especies NAD-ME como switchgrass. En nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas entre los dos subtipos a nivel de tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> y en el contenido de nitrógeno concordando con estudios realizados por Taub and Lerdau (2000) y VanLoocke (2012).

Como mencionamos anteriormente, la luz es otro factor esencial para el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Para estudiar la respuesta fisiológica de estas tres especies frente a diferentes niveles de luz se realizó curvas  $A/PAR_i$ . La figura 4.1.6 (A) muestra el incremento en la tasa fotosintética, en las tres especies, sin llegar a la saturación a medida que aumenta la intensidad lumínica. Es decir, no hubo fotoinhibición por exceso de luz con aumentos de la irradiancia hasta los 2000  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . A su vez, la ausencia de diferencias significativas entre las tres curvas indican que existió un comportamiento similar entre estas especies C3 y C4, a diferencia de otros resultados obtenidos por Jiri Kubásek *et al.* (2013). La alta capacidad fotosintética que presenta la caña común podría estar asociada con la ausencia de saturación a altos niveles de luz como menciona Rossa *et al.* (1998) y como ocurre en otras especies C3. Esto podría ser debido a que poseen un sistema fotosintético robusto para absorber grandes cantidades de energía luminosa o un buen sistema de disipación del exceso de energía de excitación para evitar los deterioro en los centros de reacción (Taiz y Zeiger, 2010). Los parámetros de fluorescencia de las clorofilas dan información sobre diversas reacciones del estado del PSII y de transferencia de electrones del PSII (Baker, 2008). El parámetro  $F_v/F_m$  refleja la eficiencia cuántica máxima del fotosistema PSII y se usa como un indicador sensitivo de la eficiencia fotosintética de las plantas (Kooten & Snel, 1990; Fracheboud and Leipner, 2003). En nuestro estudio, las tres especies presentaron un alto de rendimiento cuántico máximo del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ), cercano 0,80 (Fig. 4.1.5), como se espera en hojas maduras, con alta actividad fotosintética, no estresadas, ni senescentes (Murchie and Lawson, 2013). En las tres especies, a medida que se incrementaron los niveles de luz se observaron disminuciones en el quenching fotoquímico ( $qP$ ) (Fig. 4.1.6 D), lo que indicaría que hubo una disminución de los centros de reacción abiertos, y también disminución en la eficiencia de la captura de energía de excitación por PSII ( $F_v'/F_m'$ ) (Fig. 4.1.6 C). Es decir, la disminución de la eficiencia cuántica relativa del transporte de electrones PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) (Fig. 4.1.6 B) fue debida a la disminución de

estos dos parámetros como indican Genty (1989), Nogués and Baker (2000) y Baker (2008). Por otro lado, la disminución de  $F_v'/F_m'$  podría indicarnos que estas especies estarían evitando procesos de fotoinhibición por exceso de energía de excitación mediante procesos de disipación térmica (Demmig-Adams *et al.*, 1996; Maxwell and Johnson, 2000). Algunos estudios realizados en caña común (Hewitt *et al.*, 1990) indican una importante biosíntesis de productos secundarios como isopreno lo cual representaría un significativo sumidero de electrones.

### 5.1.3. Análisis Isotópico

El estudio de isótopos estables es una herramienta útil para conocer el metabolismo de la planta, las diferencias que existen en la composición isotópica entre especies y por otro lado, con la técnica del marcaje con  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  podemos estudiar cómo el  $\text{CO}_2$  asimilado por las hojas y el  $\text{NO}_3$   $\text{NH}_4$  fijado por las raíces es gestionado (traslocado y particionado) en la planta entera (Robinson, 2001; Tcherkez & Hodges, 2008).

La composición isotópica de  $^{13}\text{C}$  de la MOT al momento T0 (antes del marcaje) presentó valores más negativos que la composición isotópica del aire ( $-11,46 \text{ ‰} \pm 0,72$ ), lo cual significó un empobrecimiento del  $^{13}\text{C}$  en la MOT. Diferencias significativas fueron encontradas en la composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) entre las especies C3 ( $-32 \text{ ‰}$ ) y C4 ( $-13 \text{ ‰}$ ) (Fig. 4.1.10 B), y se deben directamente al fenómeno de discriminación isotópica (Tabla 4.1.3) ejercida por los principales enzimas carboxilantes Rubisco (Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa) presente en las hojas de plantas C3 y a la PEPC (Fosfoenolpiruvato carboxilasa) en las hojas de C4 (Farquhar *et al.*, 1982; Ghashghaie and Tcherkez, 2013). La menor discriminación en las plantas C4 no solo es consecuencia de las enzimas que participan en la fotosíntesis C4 sino también se debe a que el bicarbonato, que es fijado en las células del mesófilo por PEPC para formar el ácido de cuatro carbonos (Hatch *et al.*, 1967), está enriquecido en  $^{13}\text{C}$  en comparación con  $\text{CO}_2$  y que la discriminación contra  $^{13}\text{C}$  por PEPC es mucho menor que la Rubisco. El ácido de 4 carbonos una vez fijado pasa a las células la vaina del haz donde es descarboxilado, elevando la concentración de  $\text{CO}_2$  en torno Rubisco (Brown and Smith 1974; Henderson *et al.*, 1992; Cernusak *et al.*, 2013). Al comparar entre las especies C4, no se obtuvieron diferencias significativas en la composición isotópica de la MOT entre los subtipos NAD-ME y NADP-ME a diferencia de otros trabajos publicados (Hattersley, 1982; Cernusak *et al.* 2013).

Por otro lado, el enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  en el  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  respirado por los diferentes órganos en T0 respecto  $\delta^{13}\text{C}$  de la MOT (C4  $\delta$ -12 ‰ y C3  $\delta$ -21 ‰) (Fig. 4.1.10 A), responden a procesos

de discriminación durante la respiración en la oscuridad como es mencionado por Ghashghaie *et al.* (2003) y coincidiendo con resultados obtenidos por Cousins *et al.* (2006) y Ghashghaie and Tcherkez (2013). El enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$ , tanto en la MOT como en el  $\text{CO}_2$  respirado por los órganos de las plantas, después de 24 h en ambiente saturado con  $^{13}\text{CO}_2$  (T1) (Fig. 4.1.10), demuestra que las plantas asimilaron este  $^{13}\text{CO}_2$  mediante la fotosíntesis y lo incorporaron a los procesos de respiración, translocación y el almacenamiento. La diferencia de composición isotópica entre órganos de cada planta apoya la teoría de la discriminación post-fotosintética (Badeck *et al.*, 2005). Kinmonth-Schultz *et al.*, 2011; Nogués *et al.*, 2004; Aljazairi *et al.*, 2014 mencionan que la respiración, translocación y almacenamiento de fotoasimilados hacia los diferentes órganos son procesos que también pueden inducir fraccionamiento de  $^{13}\text{C}$ . El mayor enriquecimiento de  $^{13}\text{C}$  en la MOT del tallo con respecto a la hoja y raíz, en las tres especies, nos sugiere que al momento de muestreo el tallo podría estarse comportando como órgano de transporte de fotoasimilados enriquecidos hacia los puntos de crecimiento (Brugnoli and Farquhar, 2000) o como un órgano sumidero de tipo temporal. Por otro lado, el mayor enriquecimiento de  $^{13}\text{C}$  en la MOT y en el  $\text{CO}_2$  respirado en rizoma con respecto a la hoja y raíz, indicaría que actuó como órgano sumidero de carbono (Aljazairi *et al.*, 2014). Una semana después de la finalización del marcaje (T2), el menor enriquecimiento que presentaron los órganos comparado con T1, tanto en MOT como en el  $\text{CO}_2$  respirado, indicaría que  $^{13}\text{C}$  podría perderse por la respiración mitocondrial como menciona Nogués *et al.* (2004). Sin embargo, a pesar que hubo una disminución del enriquecimiento a nivel general en todos los órganos, el rizoma fue el que permaneció más enriquecido en  $^{13}\text{C}$  con respecto a raíz, tallo y hoja. Por lo cual el rizoma podría ser considerado como un órgano sumidero de tipo permanente a diferencia del tallo.

El bajo porcentaje (<10%) de carbono nuevo ( $\text{C}_{\text{nuevo}}$ ) en el  $\text{CO}_2$  respirado a las 24 horas de finalizado el marcaje (Tabla 4.1.4) confirma que después de un período de luz, el C del  $\text{CO}_2$  liberado mediante el proceso de respiración, no proviene del carbono recientemente asimilado por la fotosíntesis sino de pools de carbono 'viejos', es decir previamente almacenados Nogués *et al.* (2004; 2006b, 2014); Aranjuelo *et al.* (2009a). Las tres especies asimilaron aproximadamente la misma cantidad de  $\text{CO}_2$  marcado ( $1000 \text{ mmol C m}^{-2}$  por día de marcaje (Nogués *et al.*, 2014), sin embargo la caña común tuvo el mayor % de  $\text{C}_{\text{nuevo}}$  en la MOT (Tabla 4.1.5), debido a la mayor tasa de asimilación en esta especie respecto a las especies  $\text{C}_4$ , lo que favoreció la mayor entrada e incorporación de  $^{13}\text{C}$  al metabolismo de la planta (Nogués *et al.*, 2014). En general, la composición isotópica de  $^{15}\text{N}$  en la MOT (Fig. 4.1.11), en las tres especies al momento T0, estuvo dentro de los rangos esperados de abundancia natural (Handley *et al.*,

1999, Tcherkez and Hodges, 2008). A su vez, hoja y tallo también fueron los órganos más enriquecidos con  $^{15}\text{N}$  respecto a raíz y rizoma, sugiere que la hoja se comportó como un órgano sumidero y el tallo podría interpretarse como un órgano de transporte o como sumidero temporal. Estas diferencias encontradas entre órganos podrían deberse a la discriminación contra  $^{15}\text{N}$  durante los procesos de absorción, reducción, asimilación y redistribución en la planta como lo indica Yoneyama (1995). Para interpretar la gestión del N por las plantas se realizó un marcaje isotópico con  $^{15}\text{N}$  y se utilizó una solución nutritiva de  $^{15}\text{NH}_4\text{-}^{15}\text{NO}_3$  (es decir, doblemente marcada con  $^{15}\text{N}$ ), ya que el N puede ser absorbido en la forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Coraspe- León *et al.*, 2009). Todos los órganos en las tres especies presentaron valores de  $\delta^{15}\text{N}$  por encima de +100‰ en T1, lo que indicaría que el  $^{15}\text{N}$  fue incorporado al metabolismo por las raíces y luego fue traslocado hacia los distintos órganos de la planta. En T2, las tres especies mantuvieron esos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  por encima de +100‰.

## **5.2. EXPERIMENTO II: CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS TRES ESPECIES EN CONDICIONES DE CLIMA MEDITERRÁNEO**

Como ya hemos visto en el experimento anterior, el rendimiento o la productividad de biomasa es el resultado de la interacción de diferentes factores como la fotosíntesis, morfología de la planta (arquitectura y AF), estado hídrico, disponibilidad de nutrientes, etc. Sin embargo, en condiciones no controladas o de campo, estos parámetros pueden ser alterados por las condiciones climáticas durante el crecimiento. Es por eso, que después de realizar la caracterización de las tres gramíneas perennes en condiciones controladas (Experimento I), nos planteamos evaluar su comportamiento en condiciones de clima Mediterráneo, el cual se caracteriza por presentar inviernos suaves y veranos muy cálidos, con precipitaciones principalmente durante el otoño y en menor medida en primavera y períodos secos durante la estación de verano (Scordia *et al.*, 2014), que coincide con el período de crecimiento de las especies estudiadas.

### **5.2.1. Medidas de crecimiento**

El mismo comportamiento expresado en condiciones controladas fue observado a campo en condiciones de regadío, es decir la caña común fue la especie que presentó una mayor producción de biomasa seguida de miscantus y después switchgrass. Mientras que en condiciones de secano, debido al déficit hídrico hubo menor crecimiento y producción de

biomasa en las tres gramíneas perennes, sobre todo en las C4. Mostrando claramente el efecto limitante del agua en la productividad de los cultivos en ambiente Mediterráneo (Nogués *et al.*, 2001; Araus *et al.*, 2002; Cattivelli *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar del menor rendimiento en la biomasa logrado en condiciones de secano, es importante destacar que el comportamiento en condiciones de secano fue diferente para cada especie, siendo unas más afectadas que otras. La caña común en condiciones de secano se vio menos afectada en comparación con las especies C4, este comportamiento podría atribuirse a su mayor capacidad de desarrollar grandes sistemas subterráneos con rizomas resistentes a la sequía y gruesas raíces profundamente penetrantes que llegan a las fuentes profundas de agua como es mencionado por Lewandowski *et al.* (2003).

### 5.2.2. Medidas de fisiológicas

En condiciones de secano, la disminución en el contenido relativo de agua en las plantas a lo largo del período de crecimiento, afectó la productividad de las tres especies. Esto pudo deberse a que, en condiciones de déficit hídrico el contenido de agua de la planta disminuye, lo que hace que las células pierdan la presión de turgencia. La pérdida de presión de turgencia en las células inhibe actividades como la expansión celular, afectando directamente al crecimiento de toda la planta (Arve *et al.*, 2011). Además, niveles del CHA por debajo del 80% implicaría un potencial de agua del orden de -1,5 MPa, que provoca cambios en el metabolismo y acumulación de prolina y de ácido abscísico (Slatyer, 1967). El aumento de los niveles de ABA en hojas induciría al cierre de los estomas o decrecimiento de la conductancia estomática ( $g_s$ ). El cierre de estomas tiene efectos negativos en la fotosíntesis, transpiración, así como en la absorción agua y de nutrientes (Flexas *et al.*, 2006; Parent *et al.*, 2009). Las tres especies presentaron disminuciones en conductancia estomática ( $g_s$ ) y esta respuesta a la falta de agua fue acompañado de disminución en las tasas de asimilación de  $CO_2$  ( $A_{sat}$ ) y reducciones de los parámetros  $V_{c, max}$ ,  $J_{max}$  como menciona Nogués and Baker (2000), Cornic (2000) y Nogués and Alegre (2002) en varias especies creciendo en condiciones mediterráneas. Si bien las disminuciones se observaron en las tres especies, las más afectadas por la falta de agua durante el período de crecimiento fueron las plantas C4 y, concretamente, miscantus fue más afectada que switchgrass. Si bien, la mayor EUA es resultado de una menor conductancia estomática, característico de las C4, éstas especies son altamente sensibles al estrés hídrico ya que rápidamente cierran los estomas y, por tanto, decrecen su conductancia estomática y disminuyen la asimilación de  $CO_2$  (Ghannoum, 2009). Es decir, frente a un déficit hídrico severo, las plantas



C4 no son más tolerantes que las C3; ya que el mecanismo C4 es una adaptación encaminado al uso eficiente del agua bajo ciertas limitaciones de agua, no a la tolerancia frente a un estrés hídrico severo (Leegood, 1993). La especie miscantus al momento T1 mostró disminuciones entre 60 y 80% en los diferentes parámetros fotosintéticos medidos con respecto a T0, y en T2 todas las plantas presentaban senescencia foliar y CHA <30%. Esto sugeriría, que esta especie no fue capaz de responder rápidamente al déficit hídrico, mediante el cierre de los estomas y con ello conservar la mayor cantidad de agua posible, y como consecuencia las plantas se marchitaron y murieron (Arve *et al.*, 2011) a diferencia de switchgrass que en T1 pudo haber respondido mejor más al cierre de estomas y por eso en T2 sus plantas aún no estaban secas. Esta diferencia de comportamiento frente al déficit hídrico entre subtipos NADP-ME (miscantus) y NAD-ME (switchgrass) se debe a que las especies NAD-ME predominan en ambientes de más áridos, son más tolerantes al déficit hídrico y tienen una mayor EUA (Ghannoum, 2002). Mientras que las especies NAD-ME son frecuentes en ambientes más húmedos (Ehleringer, 1993). En condiciones de secano, se redujeron las tasas de asimilación a medida que se incrementaron los niveles de luz. Pero los valores de  $F_v/F_m$  no disminuyeron en comparación con los datos obtenidos en condiciones de riego, lo que significa que esta reducción de  $A_{sat}$  se debe a la disminución de la  $g_s$  y a al bajo contenidos de  $ci$ , y no a la disminución de la tasa de transporte de electrones fotosintéticos (Cornic *et al.*, 1992). Al igual que en el experimento I, las tres especies en condiciones de secano presentaron altos valores de  $F_v/F_m$ , es decir que la eficiencia fotoquímica máxima de PSII, se vio poco afectada por el menor contenido de agua indicando la ausencia de fotoinhibición en los centros de reacción del PSII (Lawlor & Cornic, 2002), a diferencia de lo que sucede en otras especies (Nogués and Baker, 2000; Nogués and Alegre, 2002). Los parámetros  $F_v'/F_m'$ ,  $qP$  y  $\Phi_{PSII}$  disminuyeron a medida que aumento el nivel de luz como se observó en el experimento I, sin embargo se observaron diferencias en el comportamiento de cada especie frente a condiciones de secano. En las especies C4 hubo diferencia entre los resultados obtenidos con riego y en secano siendo más pronunciada la caída de los diferentes parámetros en condiciones de secano. En la caña común no hubo diferencias, lo que indicaría una mayor sensibilidad en la eficiencia cuántica del transporte de electrones de las especies C4 en condiciones de déficit hídrico en comparación con la caña común (Ghannoum, 2002).

### 5.3. EXPERIMENTO III: ENSAYOS DE GERMINACIÓN EN *PANICUM VIRGATUM* L.

#### 5.3.1. Experimento IIIa: Evaluación de diferentes métodos para romper la dormición en la semilla de *Panicum virgatum* L.

El bajo PG% obtenido en condiciones control (semillas sin tratamiento pre-germinativo) evidencian presencia de dormición en estas semillas. La dormición es uno de los inconvenientes que presentan las semillas de muchas gramíneas estivales, como *Panicum virgatum* L. Esta limitación afecta tanto a la germinación como a la uniformidad de emergencia y establecimiento de las plántulas (Sautter, 1962; Beckman *et al.*, 1993; Shidaee *et al.*, 1969; Jensen and Boe, 1991; Aiken and Springer, 1995; Haynes *et al.* 1997; Smart and Moser, 1997; Smart and Moser, 1999; Knapp, 2000; Monti *et al.* 2001; Barney *et al.* 2009; Checovich y Ruiz, 2012; van der Wiejde *et al.* 2013). Algunas especies de la familia Poáceas se caracterizan por presentar inhibidores de la germinación en el embrión y que están involucrados en el mantenimiento de la dormición (Baskin and Baskin, 2004; Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006). Autores como Wolf y Fiske (1995), Sanderson *et al.* (1996) y Shen *et al.* (2001) han demostrado que al momento de la cosecha, más de 90% de las semillas presentan dormición; y que desciende naturalmente con períodos de almacenamientos prolongados, de hasta dos años en un ambiente cálido. A partir de estos datos, diversas técnicas se han realizado para superar esta dormición y favorecer una rápida germinación y establecimiento del cultivo. En su mayoría son tratamientos y acondicionamientos empleados antes de la germinación, con el fin de reactivar el metabolismo y reducir el número de semillas con dormición.

En nuestro ensayo, con el método hidropriming (tratamientos 1 y 2), no se obtuvieron incrementos en los PG final, es decir no hubo diferencias significativas con respecto al control (Fig.4.3.1). Por lo que este método, en el cual se hidrata parcialmente a las semillas para que inicie el proceso de germinación (fase I y II) y luego secadas para evitar la emergencia de la radícula (fase III) no fue efectivo, a diferencia como sucede en semillas de otras especies (Valdés *et al.*, 1985; Khan, 1992; Sánchez *et al.*, 2001; Tavili *et al.*, 2010). Otro de los métodos que utilizamos fue el prechilling o estratificación, en nuestros resultados se puede observar que su aplicación tuvo un gran efecto incrementando el PG final (tratamientos 3, 4, 5, 6 y 8) con respecto al control (Fig. 4.3.1). Autores como Hsu *et al.* (1985); Zarnstorff *et al.* (1994); Wolf and Fiske (1995); Sanderson *et al.* (1996); Haynes *et al.* (1997); Smart and Moser (1999); Shen *et al.* (2001); Kazimierz and Szczotka (2008), entre otros, confirman que la existencia de la dormición es debida a la presencia de sustancias inhibitoras de la germinación en el embrión. Dentro de

los posibles inhibidores implicados destaca el ácido abscísico (ABA) (Bewley, 1997; Rodríguez-Gacio *et al.*, 2009). Con la estratificación se estaría contrarrestando el efecto de estas sustancias inhibitorias, ya que las temperaturas óptimas para romper la dormición son generalmente cerca de 5 °C (Bewley and Black, 1994). Con la disminución de los niveles de ABA se incrementaría la capacidad de respuesta a las giberelinas (GAs) lo que favorecería la salida del estado de dormición embrionaria (Karssen *et al.*, 1989; Hilhorst and Karssen, 1992; Derkx *et al.*, 1994). El ABA actúa como un regulador positivo de la dormición y negativo de la germinación, mientras que las GAs tiene el efecto opuesto. Se cree que la proporción real de la relación ABA/GAs es lo que regula estos procesos y no los niveles absolutos por si solos. En muchos casos, los cambios en las condiciones ambientales son importantes para la regulación de dormición o la germinación de las semillas, ya que conducen a alteraciones en la transcripción de los genes implicados en el metabolismo de ABA o AGs (Kazimierz and Szczotka, 2008). Esto sugiere que los niveles de ABA y AGs son fundamentales para el mecanismo por el cual están regulados la dormición y la germinación (Kendall *et al.*, 2011). Con el prechilling se tiende a imitar a las condiciones naturales a las que se ve sometida la semilla. En especies de clima templado, las bajas temperaturas representan un mecanismo natural que asegura que la germinación se produzca en primavera por lo que están dormidas en el momento de la dispersión en otoño. Luego la dormición desciende de manera constante y altos niveles de germinación son posibles, coincidente con el aumento de la temperatura y del agua en la primavera (Probert, 1992). La falta de diferencias significativas en el PG entre los tratamiento 3 y 5, donde se combinaron los métodos de prechilling y priming a diferentes tiempos (7 y 14 días) (Fig. 4.3.1), indicaría que el incremento en el PG fue debido al efecto del método prechilling y no al priming. Tampoco se observaron diferencias significativas en el PG entre los tratamientos 4 y 6, donde se aplicó solamente el método de prechilling y se comparó el tiempo de estratificación, durante 7 y 14 días respectivamente (Fig. 4.3.1). En el tratamiento 7 (sin tratamiento pre-germinativo), hubo un incremento del PG final en relación al control, los resultados sugieren que el régimen de temperatura alterna de 30-15°C, en la cámara de germinación, influyó sobre la ruptura de la dormición así como sucede en numerosas especies (Probert, 1992; Otegui *et al.*, 2005; Lovey *et al.*, 2010) y específicamente en gramíneas como *Panicum maximum* var. *trichoglume* (Harty & Butler, 1975), *Bothriochloa laguroides* y *Chaetotropis elongata* (Ferrari, 1999), *Briza subaristata* (Ferrari *et al.*, 2002), *Andropogon hallii* (Stubbenieck & McCully, 1972), *Brachiaria humidicola* (Carneiro *et al.*, 1986), y *Bromus catharticus* (Larsen *et al.*, 1973). Copeland and McDonald (2001) sostienen que la alternancia de temperaturas crea un cambio en el balance inhibidor-promotor de la germinación: el inhibidor decrece durante el ciclo de baja temperatura (15°C) y el

promotor aumenta durante la fase de alta temperatura (30°C). Además de las condiciones de humedad, temperatura y oxígeno que se necesitan para germinar, muchas especies requieren determinadas cantidades de luz para lograrlo (Copeland and McDonald, 1995; Redondo *et al.*, 2004). Sin embargo, en el tratamiento 8 (germinación en condiciones de oscuridad) no mostró diferencias significativas respecto al control en el PG final (Fig. 4.3.1), lo que sugiere que las semillas de esta especie son fotoblásticas neutra, es decir pueden germinar tanto en condiciones luz como en la oscuridad; así como sucede con la especie *Paspalum atratum* (Kalmbacher *et al.*, 1999). No obstante, varios estudios han demostrado, en ciertas especies, que el prechilling puede reducir la necesidad de otros factores ambientales (Roberts and Benjamín, 1979; Vicente and Roberts, 1977; Probert *et al.*, 1985b) y en nuestro caso la capacidad de germinar sin luz podría considerarse un efecto enmascarado por el prechilling.

Hasta el momento hemos visto que el PG incrementó en los tratamientos con prechilling (3, 4, 5, 6 y 7) con respecto al control y que su vez no se observaron diferencias significativas entre ellos (Fig. 4.3.1). Por lo que al momento de seleccionar el mejor tratamiento, es importante tener en cuenta no solo altos valores de PG obtenidos al final del ensayo, sino también el tiempo en el que se alcanzan estos porcentajes. Para ello la regresión de Cox, nos indicó mediante cocientes el “riesgo” o probabilidad de germinación de una semilla, de un tratamiento dado, respecto a una semilla del control en cada momento del ensayo. Los tratamientos 1 y 2 no presentaron diferencias significativas respecto al control según la regresión de Cox (Tabla 4.3.2). Mientras que del resto de tratamientos, seleccionamos el tratamiento nº 6 (prechilling a 5°C durante 14 días), el cual presentó el mayor valor de riesgo relativo (3,95) respecto el control (Tabla 4.3.2). Esto significa que logró altos valores de PG en menos tiempo, PG50 a los dos días de germinado y un PG75 a los cuatro días (Tabla 4.3.1).

### **5.3.2. Experimento IIIb: Evaluación de la germinación de *Panicum virgatum* L. en condiciones de salinidad y déficit hídrico**

Una de las razones por las que la especie *Panicum virgatum* L. ha ganado importancia como cultivo para la producción de biocombustible, es por su capacidad de crecer bajo condiciones de estrés abióticos como salinidad y baja disponibilidad de agua (Alexopoulou *et al.*, 2008; Kim *et al.* 2012). La sensibilidad a la salinidad o déficit hídrico en una planta varía con la etapa de la vida o proceso considerado, siendo la germinación la etapa más sensible (Rahman and Ungar, 1990). En nuestro ensayo, la regresión de Cox mostró diferencias significativas para todos los tratamientos respecto al control, lo que significó que la calidad de germinación se vio afectada

bajo las diferentes condiciones de estrés impuestas. Sin embargo, si comparamos cual estrés afecto más que otro, vemos que tuvo mejor comportamiento bajo las condiciones de CNa con potencial hídrico de -0,8 MPa, ya que presentó el mayor valor de riesgo relativo (0,33) respecto al control (Tabla 4.3.4). La conductividad eléctrica (CE) de la solución con CNa -0,8 MPa fue de 18,50 dS m<sup>-1</sup> y no observaron diferencias significativas en el PG final entre este tratamiento y el control (Fig. 4.3.2). Existen especies como *Chloris gayana*, *Cynodon plectostachyus* (Toll Vera *et al.* 2001b), *Lasiurus scindicus* Henr. (Naz *et al.*, 2014), *Chenopodium quinoa* (Panuccio *et al.*, 2014) que también pueden germinar en suelos salinos con valores de CE entre 17- 22 dS m<sup>-1</sup>. Estos valores de CE corresponden a un nivel de salinidad alto, en el que no todas las especies pueden sobrevivir. Si bien, solo evaluamos el comportamiento alrededor de 28 días, podríamos considerar a esta especie como moderadamente tolerante a la salinidad (FAO, 2002; Quinn *et al.*, 2015). Se define la tolerancia a la salinidad como la capacidad que tiene el cultivo para soportar y crecer bajo estrés salino sin experimentar efectos perjudiciales en su desarrollo y/o producción (Munns and Tester, 2008). Las plantas desarrollan diversas estrategias para ser adaptarse al medio salino, por ejemplo, restringiendo la extracción de sales y/o ajustando la presión osmótica a través de la síntesis de prolina, glicina-betaína y otros azúcares (Greenway and Munns 1980). En nuestro caso, el alto PG final obtenido con CNa -0,8 MPa podría sugerir que la semilla realizó procesos de ajustes osmóticos para poder superar el potencial del medio en el que estuvo inmersa y así germinar; de lo contrario se deshidrataría como sucede en otras especies (Chulim *et al.*, 2014). El tiempo en el que alcanzó el PG50 y el PG75 con CNa -0,8 MPa fue mayor al control (Tabla 4.3.3), lo que indicaría que la velocidad de germinación estuvo afectada por la salinidad. Este efecto se debe a la elevada concentración salina del medio de germinación que disminuye el potencial hídrico, y por lo tanto reduce la disponibilidad de agua necesaria para la imbibición (fase I) que requiere la semilla para germinar (Bewley, 1997; Sánchez *et al.*, 2001; Kaymakanova *et al.*, 2008). Cuando se incrementó la concentración de CNa para lograr un potencial de -1,2 MPa, la tasa de germinación disminuyó en un 65 % (Fig. 4.3.2), concordando con otros estudios realizados que muestran la misma tendencia, que a mayor concentración salina menor porcentaje de germinación (Madueño *et al.*, 2006; Taffouo *et al.*, 2009; Kaymakanova, 2009; Sun *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012). Esto se debe a que la conductividad eléctrica (CE) de la solución del tratamiento de CNa con potencial hídrico de -1,2 MPa fue de 30,2 dS m<sup>-1</sup>. Este valor representa una concentración de iones (Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup>) demasiado elevada, donde solo pueden sobrevivir especies tolerantes como las plantas halófitas como lo indica la FAO (2002).

Un medio con baja cantidad de agua disponible como el simulado con el PEG 8000, impide que la semilla se hidrate suficientemente para germinar, traduciéndose en una germinación más lenta (Murillo-Amador *et al.*, 2006). El tratamiento PEG con un potencial de -0,8 MPa alcanzó un alto PG final, solo disminuyó un 10% respecto al control (Fig. 4.3.2). Sin embargo, el tiempo en el que logró dicho PG fue mayor comparado con el control. En la tabla 4.3.3 vemos que se alcanzó a un PG50 a los 14 días de iniciado el ensayo y un PG75 a los 26 días. Por lo que en condiciones de déficit hídrico las semillas de esta especie presentan mayor inconveniente para su germinación y establecimiento como menciona Quinn *et al.* (2015). Estos procesos se ven aún más afectados con PEG -1,2 MPa, donde solamente se obtuvieron valores de PG de 9% (Fig. 4.3.2). En general, podemos decir que con potenciales hídricos de -0,8 MPa se retrasa la germinación, mientras que con mayor concentración de NaCl y PEG (-1,2 MPa) se reducen los porcentajes finales de germinación debido al mayor estrés osmótico como es mencionado por Almansouri *et al.* (2001), Alam *et al.* (2002), Atak *et al.* (2006) y Kaya *et al.* (2008).

Las concentraciones de ClNa y PEG a -0,8 MPa, no solo afectaron la velocidad de germinación sino también la morfo-anatomía de la radícula, disminuyendo su longitud y grosor. Autores como Neumann *et al.* (1995), Huang and Fry (1998), Ramos *et al.* (2004), Céccoli *et al.* (2011) y Nawaza *et al.* (2012) señalan que las especies capaces de adaptarse a las condiciones de estrés osmótico, presentan modificaciones morfo-anatómicas específicas que pueden desempeñar un papel vital en la conservación del agua, y por lo tanto de gran ayuda para hacer frente a los estreses ambientales. En nuestro estudio, además de la longitud de la radícula, las condiciones de estrés impuestas afectaron el área total de la sección transversal de la radícula, que se redujo en un 33% con el tratamiento de ClNa -0,8 MPa y un 58 % con el PEG -0,8 MPa respecto al control (Tabla 4.3.6). Resultados similares se han encontrado en *Zea mays* L. (Parmar and Moore, 1968; Mokhberdoran *et al.*, 2008), *Triticum durum* Desf. (Almansouri *et al.*, 2001), *Oryza sativa* L. (Mokhberdoran *et al.*, 2009), *Cynodon dactylon* L. (Hammedd *et al.*, 2010), *Chloris gayana* Kunth (Céccoli *et al.*, 2011) y *Panicum virgatum* L. (Sun *et al.*, 2012), demostrando que estas especies pueden adaptarse y sobrevivir a estas situaciones, pero en detrimento de ralentizar su crecimiento. Esta condición, podría deberse a que las células de las plantas, al aumentar la presión osmótica de la solución del suelo, se ven obligadas a adaptarse fisiológicamente con vistas a poder seguir absorbiendo agua. Este proceso requiere un consumo de energía que se produce a costa de reducir su crecimiento (Bernstein, 1961). En general, observamos que el crecimiento de la radícula se vio más afectado en condiciones de déficit hídrico, lo cual podría deberse a que los procesos de elongación y síntesis de la pared celular

son más sensibles a la deficiencia de agua (Mokhberdorán *et al.*, 2008). Sin embargo, es importante tener en cuenta que el hecho de producir una radícula de menor longitud, más fina pero con células turgentes bajo condiciones estresantes es también un factor importante para tolerar el estrés (Huang and Frid, 1998).

A nivel anatómico, los cortes de la sección transversal de la radícula mostraron diferentes modificaciones bajo las condiciones de estrés respecto al control, principalmente a nivel de parénquima cortical y grosor de la endodermis (Fig. 4.3.5). Se observó la formación de cavidades aerenquimáticas (Fig. 4.3.5 B), resultado de la desintegración del parénquima cortical como sucede en especies halófitas (Hammedd *et al.*, 2010; 2013). Esta modificación podría ayudar no sólo en el intercambio de gases, sino también en el transporte de sales excesivas, nutrientes y agua a través de la radícula, como fue reportado en *Zea mays* L. (van der Weele *et al.*, 1996), *Imperata cilíndrica* L. (Hameed *et al.*, 2009), *Aeluropus lagopoides* L. (Naz *et al.*, 2013). También la formación de aerénquima puede servir como una barrera adicional al agua y al movimiento de soluto, ya que puede crear cavitación en la región cortical, y por lo tanto, una interrupción en la conexión entre diferentes sistemas de tejido (Ranathunge *et al.*, 2003). En condiciones de déficit hídrico (PEG -0,8 MPa), las células del parénquima cortical no se vieron afectadas, se observa la formación de grandes espacios intercelulares (Fig. 4.3.5 C), los cuales podrían favorecer la vía apoplástica. Y en ambos tratamientos (CINa y PEG -0,8 MPa), hubo un marcado engrosamiento de las paredes de la endodermis comparado con el control (Tabla 4.3.6) (Fig. 4.3.5 a, b y c), lo cual podría deberse a un aumento en la deposición de suberina en paredes internas de las células endodérmicas como lo señala Sanderson (1983). En condiciones de salinidad, autores como Reinhardt and Rost (1995); Chen *et al.* (2011) y Momayezi *et al.* (2012) han observado este comportamiento en diferentes especies. El cual es considerado como un mecanismo de impedancia contra el estrés salino, que actúa favoreciendo que el movimiento de los iones de la solución vía apoplasto se interrumpa en la endodermis. La impermeabilidad de las paredes de las células engrosadas con suberina y lignina, obliga a la solución a atravesar la membrana celular selectiva para filtración antes de entrar al cilindro central o vascular (Clarkson, 1991; Enstone *et al.* 2003). En plantas creciendo en condiciones de déficit hídrico, también se ha observado que el crecimiento de la raíz es ralentizado y hay una considerable barrera apoplástica bloqueando la vía hidráulica (Steudle, 2000; Nawaza *et al.*, 2012). Sanderson (1983); Clarkson *et al.* (1987) y Peyrano *et al.* (1997) han demostrado que el patrón de absorción de agua muestra una marcada dependencia con el desarrollo de la endodermis y se considera que el engrosamiento secundario de las paredes de la endodermis, provocan un marcado descenso

en el flujo de agua hacia el cilindro central, lo cual reduciría la entrada de sales u otros solutos tóxicos. Finalmente, en el período de recuperación, al cambiar las soluciones con potencial hídrico de  $-1,2$  MPa a condiciones control (agua destilada), las semillas germinaron alcanzando PG semejantes al control y en dos días (Figura 4.3.3). Similares resultados fueron encontrados en estudios de germinación con *Triticum durum* Desf. (Almansouri *et al.*, 2001) y *Oryza sativa* L. (Mokhberdoran *et al.*, 2009) donde muestran altas tasas de recuperación al ser colocados en condiciones control luego de estar a diferentes presiones osmóticas con ClNa y PEG. Esto indicaría que los bajos PG obtenidos bajo la solución problema, no se debieron a la presencia de dormición, viabilidad de la semilla o efecto de la toxicidad de la solución como suele suceder con iones de Cl y Na o con PEG (Hohl and Schoptfer, 1991), sino que pudo ser debido a la inhibición en la absorción de agua. Las altas concentraciones de NaCl y PEG no inhibieron la germinación de forma permanente, sino que tuvieron un efecto inhibitor temporal como sugiere Khan *et al.* (2001) y Munns (2002).





## 6. *Conclusiones*



## 6.1. Experimento I

- Durante el primer año de crecimiento y bajo condiciones óptimas y controladas, es decir en ausencia de estrés, las tres gramíneas perennes se caracterizaron por presentar altas tasas de crecimiento relativo y un mayor desarrollo de su sistema subterráneo.
- De las tres especies estudiadas, la especie C3 *Arundo donax* L. fue la que presentó una mayor actividad metabólica, con altas tasas de asimilación de CO<sub>2</sub> acompañada de altas tasas de respiración, y este comportamiento se tradujo en una mayor producción de biomasa (PS g), con respecto a las especies C4. Y entre las C4, miscantus tuvo mayor rendimiento de biomasa que switchgrass.
- A partir del uso del marcaje isotópico, podemos indicar que las hojas y raíces se comportaron como órganos fuente de C y N, respectivamente. Mientras que, el mayor enriquecimiento con <sup>13</sup>C encontrado en tallo y rizoma indicarían que se comportaron como órganos sumideros.

## 6.2. Experimento II

- Tanto en condiciones de regadío como en condiciones de secano, la especie C3 *Arundo donax* L. presentó una mayor producción de biomasa en comparación con las especies C4, por lo que en ambiente Mediterráneo la caña común parece ser una buena candidata para cultivo energético.
- En condiciones de regadío, la especie miscantus tuvo mejor comportamiento que switchgrass, sin embargo en condiciones de secano switchgrass mostró una menor sensibilidad frente al déficit hídrico que miscantus ya que la disminución de parámetros fotosintéticos (como  $A_{sat}$ ,  $A_{max}$ ,  $g_s$ ,  $V_{c, max}$  y  $J_{max}$ ) fueron mayores en esta especie.
- La falta de disminución en el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) en condiciones de secano, indica que no se vieron afectados ni los procesos de transporte electrónico ni fotofosforilación que tienen lugar en la membrana tilacoidal. La menor productividad de las especies en condiciones de secano, podría estar asociada a las menores tasas de asimilación debido a que el proceso de carboxilación del ciclo de Calvin y, sobretudo, la conductancia estomática se vieron más afectados.

### 6.3. Experimento III

#### 6.3.1. Experimento IIIa

- El método prechilling a 5 °C durante 14 días (tratamiento 6) fue el método más eficaz para romper la dormición y favorecer la germinación de las semillas, logrando un PG75 a los 4 días. Además, resulta una técnica práctica a nivel de manejo, ya que las semillas una vez cosechadas podrían ser almacenadas en una nevera (bajo condiciones de frío y humedad) por el mismo productor hasta el momento de la siembra.
- Nuestros resultados indican que el método pre-germinativo priming o hidropriming no fue efectivo para romper la dormición, ya que se obtuvieron bajos valores de PG, semejantes al control.
- La combinación de los métodos prechilling y priming también incrementaron los PG finales, sin embargo, estos resultados podrían deberse al efecto de las bajas temperaturas y no del hidropriming.
- La alternancia de temperatura 30/15 °C en semillas sin tratamiento pre-germinativo, fue un estímulo suficiente para romper la dormición y obtener altos valores de PG, lo que resulta también un método eficiente para romper la dormición en cámara de germinación pero no una técnica práctica para el productor.

#### 6.3.2. Experimento IIIb

- Potenciales hídricos de -0,8 MPa retrasan la germinación y crecimiento, mientras que potenciales de -1,2 MPa reducen los porcentajes finales de germinación de la especie *Panicum virgatum* L.
- El PG final, la velocidad de germinación y el crecimiento de la radícula tuvieron mejor comportamiento en condiciones de salinidad (CNa) que en condiciones de déficit hídrico (PEG).
- Las plántulas fueron menos tolerantes a las condiciones de déficit hídrico (PEG), ya que parámetros morfológicos, como longitud y grosor de la radícula, se vieron más afectados bajo estas condiciones de crecimiento.
- Las modificaciones en caracteres morfo-anatómicos de la radícula como la formación de aerénquima en la corteza y el engrosamiento de las paredes de la endodermis, podrían

contribuir significativamente a incrementar la supervivencia y la tolerancia de esta especie bajo condiciones de salinidad y déficit hídrico.



## 7. *Bibliografía*





- Aiken GE, Springer, TL. (1995). Seed size distribution, germination and emergence of 6 switchgrass cultivars. *Journal of Range Management*, 48: 455-458.
- Alam MZ, Stuchbury T and Taylor REL. (2002). Effect of NaCl and PEG induced osmotic potentials on germination and early seedling growth of rice cultivars differing in salt tolerance. *Pakistan Journal Biology Science*, 5: 1207-1210.
- Alexopoulou E, Sharma N, Papatheohari Y, Christou M, Piscioneri I, Panoutsou D and Pignatelli V. (2008). Biomass yields for upland and lowland switchgrass varieties grown in the Mediterranean region. *Biomass and Bioenergy*, 32: 926-933.
- Alison Mohr N and Sujatha Raman. (2013). Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. *Energy Policy*, 63: 114–122.
- Aljazairi S, Arias CV and Nogués S. (2014). Carbon and nitrogen allocation and partitioning in traditional and modern wheat genotypes under pre-industrial and future CO<sub>2</sub> conditions. *Plant Biology*, 10/2014; 17(3). DOI: 10.1111/plb.12280.
- Almansouri M, Kinet JM and Lutts S. (2001). Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant and Soil*, 231: 243-254.
- Angelini LG, Ceccarini, Nasso N and Bonari E. (2009). Comparison of *Arundo donax* L. and *Miscanthus x giganteus* in a long-term field experiment in Central Italy: Analysis of productive characteristics and energy balance. *Biomass and Bioenergy*, 33(4): 635-643. DOI: 10.1016/j.biombioe.2008.10.005
- Aranjuelo I, Cabrera-Bosquet L, Mottaleb SA, Araus JL and Nogués S. (2009a). <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotope labelling to study carbon partitioning and dark respiration in cereals subjected to water stress. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 23:2819–2828.
- Araus JL, Slafer GA, Reynolds MP and Royo C. (2002). Plant breeding and water relations in C3 cereals: what should we breed for? *Annals of Botany*, 89: 925–940.
- Arve LE, Torre S, Olsen JE and Tanino KK. (2011). Stomatal responses to drought stress and air humidity, abiotic stress in plants - Mechanisms and Adaptations, Arun Shanker (Ed.), ISBN: 978-953-307-394-1, In Tech, DOI: 10.5772/24661.
- Atak M, Demir M, Kaya G, Cikili and Yasar G. (2006). Effects of NaCl on the germination, seedling growth and water uptake of triticale. *Turkish Journal Agriculture*, 30: 39-47.

- Azcón Bieto J y Talón M. (2008). Fundamentos de Fisiología Vegetal. 2ª edición McGraw-Hill Interamericana, pp. 651.
- Badeck FW, Tcherkez G, Nogués S, Piel C and Ghashghaie J. (2005). Pos-photosynthetic fractionation of stable isotopes between plant organs- a widespread phenomenon. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19: 1381- 1391.
- Baker NR. (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 89-113.
- Barney J N, Mann JJ, Kyser GB, Blumwald E, Van Deynze A and DiTomaso JM. (2009). Tolerance of switchgrass to extreme soil moisture stress: Ecological implications. *Plant Science*, 177 (6): 724-732. DOI: 10.1016/j.plantsci.2009.09.003
- Baskin JM and Baskin CC. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14: 1–16.
- Beale CV and Long SP. (1995). Can perennial C4 grasses attain high efficiencies of radiant energy conversion in cool climates? *Plant, Cell & Environment*, 18 (6): 641-650.
- Beckman JJ, Moser LE, Kubik K and Waller SS. (1993). Big bluestem and switchgrass establishment as influenced by seed priming. *Agronomy Journal*, 85: 199-202.
- Bernstein L. (1961). Osmotic adjustment of plants to saline media. Steady state. *American Journal of Botany*, 48: 909-918.
- Bewley J and Derek. (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9: 1055-1 066.
- Bolton JK and Brown RH. (1980). Photosynthesis of grass species differing in carbon dioxide fixation pathways: V. Response of *Panicum maximum*, *Panicum milioides* and *Tall fescue* (*Festuca arundinacea*) to nitrogen nutrition. *Plant Physiology*, 66: 97-100. DOI:10.1104/pp.66.1.97.
- Bowman WD, Hubick KT, Von Caemmerer S and Farquhar GD. (1989). Short-term changes in leaf carbon isotope discrimination in salt- and water-stressed C4 grasses. *Plant Physiology*, 90: 162-166.
- Bowman WD. (1991). Effect of nitrogen nutrition on photosynthesis and growth in C4 *Panicum* species. *Plant, Cell and Environment*, 14: 295–301.
- Boyer JS. (1967). Plant-water relationships. Slatyer RO. Academic Press, New York, pp 378.

- Brown and Smith. (1974). The Kranz syndrome in *Uniola* (Gramineae). Bulletin of the Torrey Botanical Club, 101:117-120.
- Brugnoli E and Farquhar GD. (2000). Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. In: Leegood RC, TD Sharkey and von Caemmerer S (Eds.) Photosynthesis: physiology and metabolism. Advances in photosynthesis. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 399-434.
- Burner DM, Tew TL, Harvey JJ and Belesky D P. (2009). Dry matter partitioning and quality of *Miscanthus*, *Panicum* and *Saccharum* genotypes in Arkansas, USA. Biomass and Bioenergy, 33: 610-619.
- Byrd GT, Sage RF, and Brown R. (1992). A comparison of dark respiration between C3 and C4 plants. Plant Physiology, 100: 191-198.
- Carneiro JW, Rosseto MZ and Giovanni R. (1986). Influência da posição da semente no substrato e da temperatura de germinação no desempenho de dois lotes de sementes de *Brachiaria humidicola*. Revista Brasileira de Sementes, 8: 41-46.
- Carpita NC and McCann MC (2008). Maize and sorghum: genetic resources for bioenergy grasses. Trends in Plant Science, 13 (8): 415-420.
- Cattivelli L, Rizza F, Badeck FW, Mazzucotelli E and Mastrangelo AM. (2008). Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. Field Crops Research, 105: 1-14.
- Céccoli G, Ramos JC, Ortega LI, Acosta JM and Perreta MG. (2011). Salinity induced anatomical and morphological changes in *Chloris gayana* Kunth roots. Biocell, 35: 9-17.
- Ceotto E, Di Candili, Castelli F, Badeck F-W, Rizza F, Soave C, Volta A, Villani G and Marletto V. (2013). Comparing solar interception and use efficiency for the energy crops giant reed (*Arundo donax* L.) and sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). Field Crops Research, 149: 159-166.
- Cerling TE, Harris JM, Mac Fadden BJ, Leakey MG, Quade J, Eisenmann V and Ehleringer JR (1997). Global vegetation change through the Miocene-Pliocene boundary. Nature, 389: 153-158.
- Charles Michael B, Rachel R, Neal R and Oloruntoba R. (2007). Public policy and biofuels: The way forward? Energy Policy, 35: 5737-5746.

- Chaves M, Flexas J and Pinheiro C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103: 551–560.
- Checovich ML y Ruiz MA. (2012). Variación en el nivel de dormición de la semilla en distintas variedades de la forrajera estival *Panicum virgatum* L. *Revista de Investigación Agropecuaria*, 38: 165-170.
- Chen F, Rao Z, Zhang J, Jin M and Ma J. (2006). Variations of organic carbon isotopic composition and its environmental significance during the last glacial on western Chinese Loess Plateau. *Chinese Science Bulletin*, 51: 1593-1602.
- Chen T, Caib X, Wuc X, Karaharad I, Schreibere L and Lina J. (2011). Casparian strip development and its potential function in salt tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, 6: 1499-1501.
- Chulim AC, Ramírez GLG, Ortega EHM, Crespo EC, Román FD, Bernal EIS y Madueño MA. (2014). Germinación y crecimiento de plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. en condiciones de salinidad. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5: 753-763.
- Clarkson DT. (1991). Root structure and sites of ion uptake. In: *Plant roots - the hidden half* (Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U, Eds). Marcel Dekker, New York, pp. 417-453.
- Clarkson DT, Robards AW, Stephens JE and Stark, M. (1987). Suberin lamellae in the hypodermis of maize (*Zea mays*) roots; development and factors affecting the permeability of hypodermal layers. *Plant Cell Environ*, 10(1): 83-93.
- Cook CDK. (1990). *Aquatic Plant Book*. SPB Academic Publishing, The Hague. The Netherlands, pp. 220.
- Copeland AD and Mc Donald MB. (1995). Seed germination. In: Copeland AD and Mc Donald MB (Ed.). *Principles of Seed Science and Technology*. 3 ed. Boston: Kluwer Academic Publishers, pp 59-110.
- Copeland AD and Mc Donald MB. (2001). *Principles of Seed Science and Technology*. 5. Seed germination. 4 ed. Norwell Massachusetts, pp 78-84.
- Coraspe-León, Muraoka T, Franzini V I, Contreras Espinal F y Ocheuze Trivelin C. (2009). N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and N-NO<sub>3</sub> uptake by potato in the tuber seed production. *Agronomía Tropical Maracay*, 59 (1): 45-58.
- Cornic G, Ghashghaie J, Genty B and Briantais JM. (1992). Leaf photosynthesis is resistant to mild drought stress. *Photosynthetica*, 27: 295-309.

- Cornic G. (2000). Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. *Trends in plant science*, 5: 197-188.
- Cousins AB and Bloom AJ. (2004). Oxygen consumption during leaf nitrate assimilation in a C3 and C4 plant: the role of mitochondrial respiration. *Plant, Cell and Environment*, 27: 1537-1545.
- Cousins AB, Murray R and von Caemmerer Susanne (2006). Carbonic anhydrase and its influence on carbon isotope discrimination during C4 photosynthesis. Insights from Antisense RNA in *Flaveria bidentis*. *Plant Physiology*, 141(1): 232-242.
- Fracheboud Y and Leipner J. (2003). The application of chlorophyll fluorescence to study light, temperature and drought stress. In: *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology* (eds. J.R. DeEll & P.M.A. Toivonen), Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp 125-150.
- Demmig-Adams B, Adams WW III, Barker DH, Logan BA, Bowling DR and Verhoeven AS. (1996). Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Plant Physiology*, 98: 253-64.
- Derx MPM, Vermeer E and Karssen CM. (1994) Gibberellins in seeds of *Arabidopsis thaliana*: biological activities, identification and effects of light and chilling on endogenous levels. *Plant Growth Regulation*, 15: 223–234.
- Dondini M, Hastings A, Saiz M, Jones B and Smith P. (2009). The potential of *Miscanthus* to sequester carbon in soil: comparing field measurement in Carlow, Ireland to model predictions. *Global Change Biology Bioenergy*, 1: 413-425.
- Duclos DV, Ray DT, Johnson DJ and Taylor AG. (2013). "Investigating seed dormancy in switchgrass (*Panicum virgatum* L.): understanding the physiology and mechanisms of coat-imposed seed dormancy." *Industrial Crops and Products*, 45: 377-387.
- Dudley TL. (2000). *Arundo donax* L. In: Bossard CC, Randall JM and Hoshvsky MC (Eds.). *Invasive Plants of California's Wildlands*. University of California Press, Berkeley, USA, pp. 53–58.
- Dunnett AJ and Shah N. (2007). Prospects for bioenergy. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 1: 1-18.
- Ehleringer JR and Monson RK. (1993). Evolutionary and ecological aspects of photosynthetic pathway variation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 411–439.

- Enstone DE, Peterson C and Fengsham M. (2003). Root endodermis and exodermis, structure, function and responses to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21: 335-351.
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2002). Agricultural drainage water management in arid and semi-arid areas. Kenneth K. Tanji and Neeltje C. Kielen. Paper N° 61. <http://www.fao.org/home/en/>
- Farage PK, Blowers D, Long SP and Baker NR. (2006). Low growth temperatures modify the efficiency of light use by photosystem II for CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of two chilling-tolerant C4 species, *Cyperus longus* L. and *Miscanthus x giganteus*. *Plant, Cell and Environment*, 29: 720-728.
- Farquhar GD, Ehleringer JR and Hubick KT (1989). Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 503-537.
- Farquhar GD, O'Leary MH & Berry JA. (1982). On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, 9: 121–137.
- Fernández M, Abaira V, Quereda C y Ortuño J. (1996). Curvas de supervivencia y modelos de regresión: errores y aciertos en la metodología de aplicación. *Nefrología*, 16 (5): 383-390.
- Ferrari L, Postulka EB y López C. (2002). Condiciones de germinación de semillas de *Briza subaristata* Lam. Recolectadas en diferentes sitios de la pampa deprimida (Argentina). *Revista de Investigación Agraria, Serie Producción y Protección Vegetal*, 17: 157-162.
- Ferrari L. (1999). Efectos de la temperatura y de pretratamientos en la germinación de *Bothriochloa laguroides* (DC.) Herter y *Chaetotropis elongata* (Knut) Björkman. *Revista Brasileira de Sementes, Brasília*, 21: 84-87.
- Finch-Savage WE and Leubner-Metzger G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytology*, 171: 501–523.
- Fischer G, Prieler S, van Velthuisen H, Berndes G, Faaij A, Londo M and de Wit M. (2012). Biofuel production potentials in Europe: Sustainable use of cultivated land and pastures, Part II: Land use scenarios. *Biomass and Bioenergy*, 34: 173- 187.

- Flexas J, Ribas-Carbo M, Bota J, Galme S J, Henkle M, Martínez-Cañellas S and Medrano H. (2006). Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. *New Phytologist*, 172: 73–82.
- Gardner FP, Pearce RB and Mitchell RL. (1985). *Physiology of crops plants*. Iowa State University Press. Ames, Iowa. pp 224-229.
- Genty B, Briantais JM & Baker NR. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990:87-92.
- Ghannoum O, Von Caemmerer S and Conroy JP. (2002). The effect of drought on plant water use efficiency of nine NAD–ME and nine NADP–ME Australian C4 grasses. *Functional Plant Biology*, 29 (11): 1337-1348.
- Ghannoum O. (2009). C4 photosynthesis and water stress. *Annals of Botany*, 103 (4): 635-644.
- Ghashghaie J, Badeck F-W, Lanigan G, Nogués S, Tcherkez G, Deléens E, Cornic G and Griffiths H. (2003). Carbon isotope fractionation during dark respiration and photorespiration in C3 plants. *Photochemistry Reviews*, 2: 145-161.
- Ghashghaie J. & Tcherkez G. (2013) Isotope ratio mass spectrometry technique to follow plant metabolism: principles and applications of 12C/13C isotopes. *Advances in Botanical Research*, 67:378-405.
- Greef JM and Deuter M. (1993). Syntaxonomy of *Miscanthus × giganteus* Greef et Deu. *Angewandte Botanik*, 67: 87–90.
- Greenway H and Munns R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiology*, 31:149-190.
- Grime JP. (2001) *Plant Strategies, Vegetation Processes, and Ecosystem Properties*. 2nd John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp 419.
- Haberl H, Beringer T, Bhattacharya S, Erb K and Hoogwijk M. (2010). The global technical potential of bio-energy in 2050 considering sustainability constraints. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2: 394-403.
- Hameed M, Ashraf M, Naz N and Al-qurainy F. (2010). Anatomical adaptations of *Cynodon dactylon* (L.) Pers., from the salt range Pakistan, to salinity stress root and stem anatomy. *Pakistan Journal Botany*, 42: 279-289.



- Hameed M, Nawaz T, Ashra M, Naz N, Batool R, Ahmad MSA, Riaz A. (2013). Physioanatomical adaptations in response to salt stress in *Sporobolus arabicus* (Poaceae) from the Salt Range. *Pakistan Journal Botany*, 37: 715-724.
- Handley LL, Austin A T, Robinson DA, Scrimgeour CM, Raven J A, Heaton TE, Schmidt S and Stewart GR. (1999). The  $^{15}\text{N}$  natural abundance ( $\delta^{15}\text{N}$ ) of ecosystem samples reflects measures of water availability. *Australian Journal Plant Physiology*, 26: 185-199.
- Harty RL and Butler JE. (1975). Temperature requirements for germination of green panic (*Panicum maximum* var. trichoglume), during the after-ripening period. *Seed Science and Technology*, Zürich, 3: 529-536.
- Hatch MD. (1987). C4 photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 895: 81-106.
- Hattersley PW. (1982).  $\delta^{13}\text{C}$  values of C4 types in grasses. *Australian Journal of Plant Physiology*, 9: 139–154.
- Haynes JG, Wallace GP and Evans T. (1997). Seed treatments improve the germination and seedling emergence of switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *HortScience*, 32: 1222-1226.
- Heaton E, Voigt T and Long SP. (2004). A quantitative review comparing the yields of two candidate C4 perennial biomass crops in relation to nitrogen, temperature and water. *Biomass and Bioenergy*, 27: 21-30.
- Heggenstaller AH and Liebman M. (2009). Growth analysis of biomass production in sole-crop and double-crop corn systems. *Crop Science*, 49: 2215-2224.
- Henderson SA, von Caemmerer S and Farquhar. (1992). Short term measurements of carbon isotope discrimination in several C4 species. *Australian Journal Plant Physiology*, 19: 263-285.
- Hewitt CN, Monson RK and Fall R. (1990). Isoprene emissions from the grass *Arundo donax* L. are not linked to photorespiration. *Plant Science*, 66: 139-144.
- Hickman GC, VanLoocke A, Dohleman, FG and Bernacchi CJ. (2010). A comparison of canopy evapotranspiration for maize and two perennial grasses identified as potential bioenergy crops. *Global Change Biology Bioenergy*, 2: 157–168.
- Hilhorst HWM and Karssen CM. (1992). Seed dormancy and germination: the role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. *Plant Growth Regulation*, 11: 225–238.

- Hoagland DR and Arnon DJ. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. California Agriculture Experimental Station, 347: 1-32.
- Hohl M and Schopfer P. (1991). Water relations of growing maize coleoptiles: Comparison between Mannitol and Polyethylene Glycol 6000 as external osmotic for adjusting turgor pressure. Plant Physiology, 95(3): 716-722.
- Hsu FH, Nelson CJ and Matches AG. (1985). Temperature effects on germinations of perennial warm-season forage grasses. Crop Science, 25: 215-220.
- Huang B, Liu X, and Fry JD. (1998). Shoot physiological responses of two bentgrass cultivars to high temperature and poor soil aeration. Crop Science, 38:1219–1224.
- Idris S, Jones P, Salzman S, Croatto G & Allinson G. (2012). Evaluation of the giant reed (*Arundo donax* L.) in horizontal subsurface flow wetlands for the treatment of recirculating aquaculture system effluent. Environmental Science and Pollution Research, 19 (4): 1159-1170.
- International Energy Outlook (IEO). (2014). <http://www.eia.gov/forecasts/ieo/>.
- International Seed Testing Association (ISTA). (2012). International rules for seed testing. Seed Sciences and Technology, 21: 288.
- International Panel Climate Change (IPCC). (2014). Summary for Policymakers, In: Climate Change 2014, Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (AR5) [Edenhofer, O., R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, E. Farahani, S. Kadner, K. Seyboth, A. Adler, I. Baum, S. Brunner, P. Eickemeier, B. Kriemann, J. Savolainen, S. Schlömer, C. von Stechow, T. Zwickel and J.C. Minx (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Jaradat AA. (2010). Genetic resources of energy crops: biological systems to combat climate change. Australian Journal of Crop Science, 4: 309-323.
- Jensen NK and Boe A. (1991). Germination of mechanically scarified neoteric switchgrass seed. Journal Range Manage, 44: 299-301.
- Jiri Kubásek, Otmar U and Santrucek J. (2013). C4 plants use fluctuating light less efficiently than do C3 plants: a study of growth, photosynthesis and carbon isotope discrimination. Physiology Plantarum, 149: 528-539.

- Kalmbacher RS, West SH and Martin FG. (1999). Seed dormancy and aging in *atra paspalum*. Crop Science, 39: 1847-1852.
- Kaplan EL and Meier P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. J. American Statistical Association, 53: 457-481.
- Karp A and Shield I. (2008). Bioenergy from plants and the sustainable yield challenge. New Phytologist, 179: 15-32.
- Karssen CM, Zagorski S, Kepczynski J and Groot SPC. (1989). Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. Annals of Botany, 63: 71-80.
- Kaya M, Kaya G, Kaya MD, Atak M, Saglam S, Khawar KM and Ciftci CY. (2008). Interaction between seed size and NaCl on germination and early seedling growth of some Turkish cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal of Zhejiang University Science B, 9: 371-377.
- Kaymakanova M, Stoeva N and Mincheva T. (2008). Salinity and its effects on the physiological response of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Central European Agriculture, 9: 749-756.
- Kaymakanova M. (2009). Effect of salinity on germination and seed physiology in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Biotechnology Equipment, 23: 326-329.
- Kazimierz K and Szczotka Z. (2008). Influence of temperature and abscisic and gibberellic acids on polyamine biosynthesis in European beech (*Fagus sylvatica* L.) Seeds during dormancy breaking. Acta Biologica Cracoviensia, 50: 73-78.
- Kendall S, Hellwege A, Marriot P, Whalley C, Graham I and Penfield S. (2011). Induction of dormancy in Arabidopsis summer annuals requires parallel regulation of DOG1 and hormone metabolism by low temperature and CBF transcription factors. The Plant Cell, 23: 2568-2580.
- Khajeh-Hosseini M, Powell AA and Bingham IJ. (2003). The interaction between salinity stress and seed vigor during germination of soybean seeds. Seed Science and Technology, 31: 715-725.
- Khan AA. (1992). Preplant physiological seed conditioning. Horticultural Reviews, 14:131-181.
- Khan MA, Gul B and Weber DJ. (2001). Influence of salinity and temperature on the germination of *Kochia scoparia*. Wetlands Ecology and Management, 9: 483-489.

- Kim S, Rayburn AL, Voigt T, Parrish A and Lee DK. (2012). Salinity effects on germination and plant growth of Prairie Cordgrass and Switchgrass. *Bioenergy Research*, 5: 225-235.
- Kiniry JR, Johnson MV, Bruckerhoff SB, Kaiser JU, Cordtsimon RL and Harmel RD. (2012). Clash of the titans: comparing productivity via radiation use efficiency for two grasses giants of the biofuel field. *Bioenergy Research*, 5: 41-48.
- Kinmonth-Schultz H and Soo-Hyung K. (2011). Carbon gain, allocation and storage in rhizomes in response to elevated atmospheric carbon dioxide and nutrient supply in a perennial C3 grass, *Phalaris arundinacea*. *Functional Plant Biology*, 38: 797-807.
- Kleinbaum David G and Mitchel Klein. (2012). *Survival Analysis: A Self-Learning Text*, Third Edition. Springer New York USA, pp 700.
- Knapp AD. (2000). An overview of seed dormancy in native warm-season grasses. In: *Native Warm-Season Grasses: Research Trends and Issues*. Anderson BE and Moore KJ Eds. CSSA Special Pub. No. 30. Crop Science Society of America, Madison, WI. pp. 107–122
- Kooten VO and Snel JF. (1990). The use of Chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, 25: 147–150.
- Lambers H and Poorter H. (1992). Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. *Advances in Ecological Research*, 23: 187–261.
- Larsen AL, Montgillion DP and Schroeder EM. (1973). Germination of dormant and nondormant rescuegrass seed on the thermogradient plate. *Agronomy Journal*, Madison, 65: 56-59.
- Lasorella MV, Monti A, Alexopoulou E, Riche A, Sharma N, Cadoux K, van Diepen K, Elbersen B, Atzema A and Elbersen W. (2011). Yield comparison between switchgrass and miscanthus based on multi-year side by side comparison in Europe. In: 19th European biomass conference & exhibition, 6-10 June Berlin. Germany.
- Lawlor DW & Cornic G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ*, 25(2): 275-294.
- LeCain D and Morgan J. (1998). Growth, gas exchange, leaf nitrogen and carbohydrate concentrations in NAD-ME and NADP-ME C4 grass grown in elevated CO2. *Physiologia Plantarum*, 102: 297-306.

- Leegood R.C. (1993) Carbon dioxide-concentrating mechanisms. In Plant Biochemistry and Molecular Biology (ed. P. J. Lea & R. C. Leegood). John Wiley & Sons Chichester, UK, pp. 47-72.
- Lewandowski I, Scurlock J, Lindvall E, Christou M. (2003). The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass Bioenergy*, 25: 335–361.
- Long SP. (1994). The application of physiological and molecular understanding of the effects of the environment on photosynthesis in the selection of novel “fuel” crops; with particular reference to C4 perennials. In: Struick PC, Vredenberg W, Renkema JA, Parlevet JE, editors. Plant production on the threshold of a new century-congress of the 75th anniversary of Wageningen agricultural university. Dordrecht: Kluwer Academic, pp. 231–344.
- Long SP. (1999). Environmental responses. In: Sage, RF and Monson RK (Eds.) C4 Plant Biology. Academies press, San Diego. pp 215-249.
- Lovey RJ, Perissé P, Vieyra C and Coraglio JC. (2010). Seed, germination and seedling characterization of *Cologania broussonetii* (Balb.) DC. *Phyton International Journal of Experimental Botany*, 79: 5-10.
- Lynd LR, Lave L and Greene N. (2003). Cellulosic ethanol fact sheet. National Commission on Energy Policy Forum: The Future of Biomass and Transportation. Washington, DC. In: [www.energycommission.org/files/](http://www.energycommission.org/files/)
- Madueño Molina A, García Paredes D, Martínez Hernández J, Rubio Torres C, Navarrete Valencia A y Bojórquez Serrano J. (2006). Germinación de semilla de frijolillo, *Rhynchosia minima* (L.) Dc., luego de someterla a tratamientos pre-germinativos. *Bioagro*, 18: 101-105.
- Maxwell K and Johnson GN. (2000). Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51: 659-668.
- McLaughlin S B and Kszos L A. (2005). Development of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) as a bioenergy feedstock in the United States. *Biomass and Bioenergy*, 28: 515-535.
- McMurtrie RE and Wang YP. (1993). Mathematical models of the photosynthetic responses of tree stands to rising CO<sub>2</sub> concentrations and temperatures. *Plant, Cell and Environment* 16, 1-3.

- Medrano H, Bota J, Cifre J., Flexas J., Ribas-Carbó M. y Gulías J. (2007). Eficiencia en el uso del agua por las plantas. *Investigaciones Geográficas*, 43: 63-84.
- Metzger MJ, Bunce RGH, Jongman RHG, Múcher CA and Watkins JW. (2005). A climatic stratification of the environment of Europe. *Global Ecology Biogeography*, 14: 549-563.
- Michel B. (1983). Evaluation of the water potentials of solutions of polyethylene glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant Physiology*, 72: 66-70.
- Mokhberdorán F, Nabavi KSM and Sadrabadi HR (2009). Effect of temperature iso-osmotic concentrations of NaCl and PEG agents on germination and some seedling growth yield components in rice (*Oryza sativa* L.). *Asian Journal Plant Science*, 8:409-416.
- Mokhberdorán N and Heidari R. (2008). Water stress induced by Polyethylene Glycol 6000 and Sodium Chloride in two maize cultivars. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11: 92-98.
- Momayezi M R, Zaharah AR and Hanafi MM. (2012). The effects of cation ratios on root lamella suberization in rice (*Oryza sativa* L.) with contrasting salt tolerance. *International Journal of Agronomy*. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/769196>
- Monti A, Venturi P and Elbersen HW. (2001). Evaluation of the establishment of lowland and upland switchgrass (*Panicum virgatum* L.) varieties under different tillage and seedbed conditions in northern Italy. *Soil & Tillage Research*, 63: 75-83.
- Moser LE and Vogel KP. (1995). Switchgrass, big bluestem, and Indian grass. In Barnes RF *et al.* (ed.) *Forages: An introduction to grassland agriculture*. 5th ed. Iowa State Univ. Press, Ames, pp 409–420.
- Munns R and Tester M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 651–681.
- Munns R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25: 239-250.
- Murchie E and Lawson T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany Advance*, 64 (13): 3983-98.
- Murillo-Amador B, Troyo-Dieguez E, Garcia-Hernandez JL, Lopez-Aguilar R and Avila-Serrano NY. (2006). Effect of NaCl salinity in the genotypic variation of cowpea (*Vigna unguiculata*) during early vegetative growth. *Scientia Horticulturae*, 108: 432-441.

- Nackley Lloyd L, Kristiina A, Vogt, Soo-Hyung Kima. (2014). *Arundo donax* L. water use and photosynthetic responses to drought and elevated CO<sub>2</sub>. *Agricultural Water Management*, 136: 13-22.
- Naidu S and Long S. (2004). Potential mechanism of low-temperature tolerance of C<sub>4</sub> photosynthesis in *Miscanthus x giganteus* an in vivo analysis. *Planta*, 220: 145-155.
- Naidu S. (2003). "Cold Tolerance of C<sub>4</sub> photosynthesis in *Miscanthus x giganteus*: Adaptation in Amounts and Sequence of C<sub>4</sub> Photosynthetic Enzymes." *Plant Physiology*, 132 (3): 1688-1697.
- Naik SN, Vaibhav V Goud, Prasant K Rout and Ajay K. Dalai. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 578-597.
- Nassi o Di Nasso N, Roncucci N, Triana F, Tozini C and Bonari E. (2011). Productivity of giant reed (*Arundo donax* L.) and miscanthus (*Miscanthus x giganteus* Greef et Deuter) as energy crops: growth analysis. *Italian Journal of Agronomy*, 22: 141-146.
- Nawaz T, Hameed M, Wu N, Ahmad MSA, Younis A and Kanwal H. (2012). Comparative anatomy of root and stem of some native and exotic *Asparagus* L. species. *Pakistan Journal Botany*, 44: 153- 158.
- Naz N, Hameed M, Nawaz T, Batool R, Ashraf M, Ahmad F and Ruby T. (2013). Structural adaptations in the desert halophyte *Aeluropus lagopoides* (L.) Trin. ex Thw. under high salinity. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 19: 150–164.
- Naz N, Rafique T, Hameed M, Ashraf M, Batool R and Fatima S. (2014). Morpho-anatomical and physiological attributes for salt tolerance in sewan grass (*Lasiurus scindicus* Henr.) from Cholistan Desert, Pakistan. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36: 2959-2974.
- Neumann PM. (1995). Inhibition of root growth by salinity stress: Toxicity or an adaptive biophysical response. In: Baluska F, Ciamporová M, Gasparíková O and Barlow PW (Eds). *Structure and Function of Roots*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp: 299-304.
- Niinemets Ü. (1999). Components of leaf dry mass per area – thickness and density – alter leaf photosynthetic capacity in reverse directions in woody plants. *New Phytologist*, 144: 35–47.

- Nogués S and Alegre L. (2002). An increase in water deficit has no impact on the photosynthetic capacity of field-grown Mediterranean plants. *Functional Plant Biology*, 29: 621-630.
- Nogués S and Baker NR. (2000). Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *Journal of Experimental Botany*, 51: 1309 - 1317.
- Nogués S, Aljazairi S, Arias C, Sánchez E and Aranjuelo I. (2014). Two distinct plant respiratory physiotypes might exist which correspond to fast-growing and slow-growing species. *Journal of Plant Physiology*, 171: 1157-1163.
- Nogués S, Allen DJ, Morrison JIL and Baker NR. (1998). Ultraviolet-B radiation effects on water relations, leaf development and photosynthesis in drought pea plants. *Plant Physiology*, 117: 173-745.
- Nogués S, Aranjuelo I, Pardo A, Azcón-Bieto J. (2008). Assessing the stable-carbon isotopic composition of intercellular CO<sub>2</sub> in a CAM plant using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 22: 1017-1022.
- Nogués S, Damesin C, Tcherkez G, Maunoury F, Cornic G and Ghashghaie J. (2006). <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotope labelling to study leaf carbon respiration and allocation in twigs of field-grown beech trees. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20: 219-226.
- Nogués S, Munné-Bosch S, Casadesús J, López-Carbonell M and Alegre L. (2001). Daily time course of whole-shoot gas-exchange rates in two drought-exposed Mediterranean shrubs. *Tree Physiology*, 21: 53 - 60.
- Nogués S, Tcherkez G, Cornic G and Ghashghaie J. (2004). Respiratory carbon metabolism following illumination in intact French bean leaves using <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotope labelling. *Plant Physiology*, 136: 3245-3254.
- Ñústez López CE, Castellanos Santos M and Segura Abril M. (2009). Acumulación y distribución de materia seca de cuatro variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Zipaquirá, Cundinamarca (Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 62 (1): 4823-4834.
- Otegui MB, Pérez MA y De Souza MM. (2005). Efecto de la temperatura y la luz en la germinación de semillas de *Paspalum guenoarum*. *Revista Brasileira de Sementes*, 27: 190-194.



- Panuccio MR, Jacobsen SE, Akhtar SS and Muscolo A. (2014). Effect of saline water on seed germination and early seedling growth of the halophyte quinoa. *AoB Plants* 19:6 plu047; doi:10.1093/aobpla/plu047.
- Papazoglou E, Karantounias S, Vemmos S and Bouranis D. (2005). Photosynthesis and growth of giant reed (*Arundo donax* L.) to the heavy metals Cd and Ni. *Environment International*, 31: 243-249.
- Pardo A. (2006). Assimilació i gestió del carboni en plantes de creixement lent sotmeses a CO<sub>2</sub> elevat. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona.
- Parent B, Hachez C, Redondo E, Simonneau T, Chaumont F and Tardieu F. (2009). Drought and Abscisic Acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: A trans- Scale Approach. *Plant Physiology*, 179: 2000-2012.
- Parmar MT and Moore RP. (1968). Carbowax 6000, mannitol, and sodium chloride for simulating drought conditions in germination studies of corn (*Zea mays* L.) of strong and weak vigor. *Agronomy Journal Madison*, 60:192-195.
- Parrish DJ and Fike JH. (2005). The biology and agronomy of switchgrass for biofuels. *Critical Reviews in Plant Science*, 24: 423-459.
- Peyrano G, Taleisnik E, Quiroga M, de Forchetti SM and Tigier H. (1997). Salinity effects on hydraulic conductance, lignin content and peroxidase activity in tomato roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 35: 387–393.
- Pilu R, Bucci A, Cerino Badone F and Landoni M (2012). Giant Reed (*Arundo donax* L.): a weed plant or a promising energy crop? *African Journal of Biotechnology*, 11: 9163-9174.
- Pinto H, Sharwood R, Tissue D and Ghannoum O. (2014). Photosynthesis of C3, C3-C4 and C4 grass at glacial CO<sub>2</sub>. *Journal of Experimental Botany*, 65: 3669-3681.
- Poorter H, Niinemets Ü, Poorter L, Wright I J and Villar R. (2009). Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytologist*, 182: 565–588.
- Poorter H, Remkes C and Lambers H. (1990). Carbon and nitrogen economy of 24 wild species differing in relative growth rate. *Plant Physiology*, 94: 621-27.
- Probert RJ, Smith RD and Birch P. (1985b). Germination responses to light and alternating temperatures in European populations of *Dactylis glomerata* L. The effects of storage. *New Phytologist*, 101: 521-529.

- Probert RJ. (1992). The role of temperature in germination ecophysiology. In: Fenner, M (Ed) Seeds. The ecology of regeneration in plant communities. Wallingford, CAB International. pp. 285-325.
- Quinn LD, Straker KC, Guo J, Kim S, Thapa S, Kling G, Lee DK and Voigt TB. (2015). Stress-Tolerance Feedstocks for sustainable bioenergy production on marginal land. *Bioenergy Research*. (In press).
- Rahman M and Ungar IA. (1990). The effect of salinity on seed germination and seedling growth of *Echinochloa crusgalli*. *Ohio Journal of Science*, 90: 13-15.
- Ramos Julio C, Perreta MG, Tivano JC and Vegetti AC. (2004). Variaciones anatómicas en la raíz de *Pappophorum philippianum* inducidas por salinidad. *Phyton International Journal of Experimental Botany*, 53: 103-109.
- Ranathunge K, Steudle E and Lafitte R. (2003). Control of water uptake by rice (*Oryza sativa* L.): role of the outer part of the root. *Planta*, 217: 193-205.
- Redondo S, Rubio-Casal AE, Castillo JM, Luque CJ, Álvarez AA, Luque T and Figueroa ME. (2004). Influences of salinity and light on germination of three *Sarcocornia taxa* with contrasted habitats. *Aquatic botany*, 78: 255-264.
- Reinhardt DH and Rost TL. (1995). Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. *Environmental and Experimental Botany*, 35: 563–574.
- Roberts EH and Benjamin SK. (1979). The interaction of light, nitrate and alternating temperature on the germination of *Chenopodium album*, *Capsella bursa-pastoris* and *Poa annua* before and after chilling. *Seed Science and Technology*, 7: 379-392.
- Robinson D. (2001)  $\delta^{15}\text{N}$  as an integrator of the nitrogen cycle. *Trends in Ecology & Evolution*, 16: 153–162.
- Rodríguez-Gacio MC, Matilla-Vázquez MA and Matilla AJ. (2009). Seed dormancy and ABA signaling: The breakthrough goes on. *Plant Signaling & Behavior*, 4: 1035–1048.
- Rosenzweig C and Tubiello FN. (1997). Impacts of global climate change on Mediterranean agriculture: Current methodologies and future directions: An introductory essay. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 1: 219-232.
- Rossa B, Tüffers A V, Naidoo G and Von Willert D J. (1998). *Arundo donax* L. (Poaceae) a C3 species with unusually high photosynthetic capacity. *Plant Biology*, 111: 216–221.

- Sage RF and Pearcy RW. (1987a). The nitrogen use efficiency of C3 and C4 plants. Leaf nitrogen, growth and biomass partitioning in *Chenopodium album* L. and *Amaranthus retroflexus* L. *Plant Physiology*, 84: 954–958.
- Sage RF and Pearcy RW. (1987). The Nitrogen Use Efficiency of C3 and C4 Plants. *Plant Physiology*, 84 (3): 959-963.
- Sage RF. (2004). The evolution of C4 photosynthesis. *New Phytologist* 161, 341–370.
- Sánchez JA, Orta R y Muñoz BC. (2001). Tratamientos pre-germinativos de hidratación-deshidratación de las semillas y sus efectos en plantas de interés agrícola. *Revista Agronomía Costarricense*, 67-92.
- Sanderson J. (1983). Water uptake by different regions of the barley root: pathways of radial flow in relation to development of the endodermis. *Journal Experimental Botany*, 34: 240-253.
- Sanderson MA, Reed RL, McLaughlin SB, Wullschleger SD, Conger BV, Parrish DJ, Wolf DD, Taliaferro C, Hopkins AA, Ocumpaugh WR, Hussey MA, Read JC and Tischler CR. (1996). Switchgrass as a sustainable bioenergy crop. *Bioresource Technology*, 56: 83-93.
- Sauras TY, Vallejo V R, Valcke E, Colle C, Förstel H, Millán R and Jouglet H. (1999). <sup>137</sup>Cs and <sup>90</sup>Sr root uptake prediction under close-to-real controlled conditions. *Journal of Environmental Radioactivity*, 45: 191- 217.
- Sautter EH. (1962). Germination of switchgrass. *Journal Range Management*, 15:108-110.
- Scordia D, Testa G and Cosentino SL. (2014). Perennial grasses as lignocellulosic feedstock for second-generation bioethanol production in Mediterranean environment. *Italian Journal of Agronomy*, 9 (2): 84. DOI: 10.4081/ija.2014.581
- Serrato Valenti GL, Melone O and Riveros F. (1992). Anatomical changes in *Prosopis cineraria* (L.) druce seedlings growing at different levels of NaCl salinity. *Annals of Botany*, 70: 399-404.
- Shaidae G, Dahl BE and Hansen RM. (1969). Germination and emergence of different age seeds of six grasses. *Journal Range Management*, 22: 240-243.
- Shen Z, Parrish DJ, Wolf DD and Welbaum GE. (2001). Stratification in switchgrass seeds is reversed and hastened by drying. *Crop Science*, 41: 1546-1551.

- Sims REH, Hastings A, Taylor G, Smith P and Schlamadinger B. (2006). Energy crops: current status and future prospects. *Global Change Biology Bioenergy*, 12: 1-23.
- Skinner EH and Adler PR. (2010). Carbon dioxide and water fluxes from switchgrass managed for bioenergy production. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 138: 257-264.
- Slatyer RO. (1967). *Plant-water relationships*. Academic Press, New York, pp 336.
- Smart AJ and Moser LE. (1997). Morphological development of switchgrass as affected by planting date. *Agronomy Journal*, 89: 958-962.
- Smart AJ and Moser LE. (1999). Switchgrass seedling development as affected by seed size. *Agronomy Journal*, 91:335-338.
- Smith RA, Lewis JD, Ghannoum O and Tissue DT. (2012). Leaf structural response to preindustrial, current and elevated atmospheric [CO<sub>2</sub>] and temperature affect leaf function in *Eucalyptus sideroxylon*. *Functional Plant Biology*, 39:285-296.
- Solomón M, Gedalovich E, Mayer M and Poljakoff-Mayber A. (1986). Changes induced by salinity to the anatomy and morphology of excised pea roots in culture. *Annals of Botany*, 57: 811-819.
- Sosa L, Llanes A, Reinoso H, Reginato M and Luna V. (2005). Osmotic and specific ion effects on the germination of *Prosopis strombulifera*. *Annals of Botany*, 96: 261-267.
- Spurr AR. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal Ultrastructure Research*, 26: 31-43.
- Steudle E. (2000). Water uptake by roots: effects of water deficit. *Journal Experimental Botany*, 51: 1531-1542.
- Stewart RJ, Toma Y, Fernández FG, Nishiwaki A, Yamada T & Bollero GA. (2009). The ecology and agronomy of *Miscanthus sinensis*, a species important to bioenergy crop development, in its native range in Japan: a review. *Global Change Biology Bioenergy*, 1:126-153.
- Stubbendieck J and Mccully WG. (1972). Factors affecting germination, emergence and establishment of sand bluestem. *Journal of Range Management*, 25: 383-385.
- Sun G, Stewet NJ, Xiao P and Zhang. (2012). MicroRNA expression analysis in the cellulosic biofuel crop switchgrass (*Panicum virgatum* L.) under abiotic stress. [www.plosone.org](http://www.plosone.org)

- Taffouo VD, Meguekman L, Kenne M, Magnitsop A, Akoa A and Ourry A. (2009). Salt stress effects on germination, plant growth and accumulation of metabolites in five leguminous plants. *African Crop Science Society*, 9:157-161.
- Taiz L and Zeiger E. (2010). *Plant Physiology*. Sinauer Ass. Inc. Pub. Sunderland, (Mass.) USA, pp. 782.
- Taub D and Lerda M. (2000). Relationship between leaf nitrogen and photosynthetic rate for three NAD-ME and three NADP-ME C<sub>4</sub> grasses. *American Journal of Botany*, 87(3): 412–417.
- Tavili A, Zare S, Moosavi SA and Enayati A. (2010). Effects of priming techniques on seed germination and early growth characteristics of *Bromus tomentellus* L. and *Bromus inermis* L. *Notulae Scientia Biologicae*, 1: 104-108.
- Tcherkez G and Hodges M (2008). How stable isotopes may help to elucidate primary nitrogen metabolism and its interactions with (photo) respiration in C<sub>3</sub> leaves. *Journal Experimental Botany*, 59: 1685-1693.
- Tekalign T and Hammes PS. (2005a). Growth and productivity of potato as influenced by cultivar and reproductive growth. Stomatal conductance, rate of transpiration, net photosynthesis, and dry matter production and allocation. *Scientia Horticulturae*, 105 (1): 13-27.
- Toll Vera JR, Lagomarsino ED, Martin GO, Nicosia MG, Fernández MM. (2001b). Germinación, implantación y sobrevivencia de gramíneas (Poáceas) forrajeras tropicales estivales perennes, en diferentes tipos de suelos en el Oeste de la Provincia de Santiago del Estero. *Revista Argentina de Producción Animal*, 21: 83-84.
- Valdes VM, Bradford KJ and Mayberry KS. (1985). Alleviation of thermodormancy in coated lettuce seeds by seed priming. *HortScience*, 20: 1112-1114.
- Van der Weele CM, Canny MJ, McCully ME. (1996). Water in aerenchyma spaces in roots. A fast diffusion path for solutes. *Plant & Soil*, 184:131-141.
- Van der Weijde T, Alvim Kamei CL, Torres AF, Vermerris W, Dolstra O, Visser RGF. (2013). The potential of C<sub>4</sub> grasses for cellulosic biofuel production. *Frontiers Plant Science*, 4: 107-118.
- Vanlooche A, Twine T, Zeri M and Bernacchi C. (2012). A regional comparison of water use efficiency for miscanthus, switchgrass and maize. *Agricultural and Forest Meteorology*, 164: 82-95.

- Vincent EM and Roberts EH. (1977). The interaction of light, nitrate and alternating temperatures in promoting the germination of dormant seeds of common weed species. *Seed Science Technology*, 5: 659-670.
- Von Caemmerer S and Farquhar GF. (1981). Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, 153: (4) 376-387.
- Warner DA, Ku MSB and Edwards GE. (1987). Photosynthesis, leaf anatomy, and cellular constituents in the polyploid C4 grass *Panicum virgatum* L. *Plant Physiol.*, 84: 461-466.
- Westoby M, Falster DS, Moles AT, Vesk PA and Wright IJ. (2002). Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology & Systematics*, 33: 125-159.
- Whyte RO, Moir TG y Cooper JP. (1959). Las gramíneas en la agricultura. FAO: Estudios Agropecuarios N° 42. Roma, Italia, pp 646.
- Wolf DD and Fiske DA. (1995). Planting and managing switchgrass for forage, wildlife, and conservation. Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia Cooperative Extension Publication, pp 418-013.
- Wolfe DW, Gifford RM, Hilbert D and Luo Y. (1998). Integration of photosynthetic acclimation to CO<sub>2</sub> at the whole-plant level. *Global Change Biology Bioenergy*, 4: 879-93.
- Yoneyama T. (1995). Nitrogen metabolism and fractionation of nitrogen isotopes in plants. In: *Stable Isotopes in the Biosphere*. (Eds. E. Wada, T Yoneyama, M. Minagawa, T. Ando and B.D. Fry.). Kyoto University Press: Kyoto, pp. 92-102.
- Zarnstorff ME, Keys RD and Chamblee DS. (1994). Growth regulator and seed storage effects on switchgrass germination. *Agronomy Journal*, 86: 667-672.
- Zhu X G, De Sturler E and Long SP. (2007). Optimizing the distribution of resources between enzymes of carbon metabolism can dramatically increase photosynthetic rate: A numerical simulation using an evolutionary algorithm. *Plant Physiology*, 145: 513-526.



## 8. *Anexos*





## Datos suplementarios:

Tabla S1: Tratamiento estadístico de los datos de los parámetros de fluorescencia modulada de las clorofilas. Los datos representan la media  $\pm$  ES de tres réplicas (n= 3). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P=0,05$ ) entre especies.

|               | PARi | <i>Panicum virgatum</i> L. | <i>Miscanthus x giganteus</i> | <i>Arundo donax</i> L. |
|---------------|------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|
| A             | 0    | -2,00 $\pm$ 0,50a          | -2,19 $\pm$ 0,44a             | -0,73 $\pm$ 0,31a      |
|               | 30   | 0,06 $\pm$ 0,56a           | -0,35 $\pm$ 0,07a             | 0,34 $\pm$ 0,16a       |
|               | 60   | 0,95 $\pm$ 0,31ab          | -0,13 $\pm$ 0,80a             | 1,80 $\pm$ 0,26b       |
|               | 100  | 2,87 $\pm$ 0,33a           | 2,68 $\pm$ 0,45a              | 3,19 $\pm$ 0,13a       |
|               | 300  | 10,42 $\pm$ 0,49a          | 9,67 $\pm$ 0,13a              | 9,86 $\pm$ 1,19a       |
|               | 600  | 16,67 $\pm$ 0,69a          | 17,40 $\pm$ 0,32a             | 18,03 $\pm$ 1,18a      |
|               | 1200 | 22,03 $\pm$ 0,43a          | 23,70 $\pm$ 0,70a             | 22,63 $\pm$ 1,88a      |
|               | 2000 | 25,10 $\pm$ 0,50a          | 27,57 $\pm$ 2,15a             | 25,60 $\pm$ 1,55a      |
| $\Phi_{PSII}$ | 0    | 0,66 $\pm$ 0,03a           | 0,69 $\pm$ 0,01a              | 0,75 $\pm$ 0,00b       |
|               | 30   | 0,60 $\pm$ 0,02ab          | 0,55 $\pm$ 0,04a              | 0,67 $\pm$ 0,00b       |
|               | 60   | 0,59 $\pm$ 0,02ab          | 0,53 $\pm$ 0,03a              | 0,66 $\pm$ 0,00b       |
|               | 100  | 0,56 $\pm$ 0,02ab          | 0,49 $\pm$ 0,03a              | 0,63 $\pm$ 0,00b       |
|               | 300  | 0,48 $\pm$ 0,02ab          | 0,42 $\pm$ 0,03a              | 0,57 $\pm$ 0,00b       |
|               | 600  | 0,39 $\pm$ 0,01a           | 0,33 $\pm$ 0,02b              | 0,48 $\pm$ 0,01c       |
|               | 1200 | 0,24 $\pm$ 0,01a           | 0,21 $\pm$ 0,01a              | 0,31 $\pm$ 0,02b       |
|               | 2000 | 0,13 $\pm$ 0,01a           | 0,11 $\pm$ 0,01a              | 0,17 $\pm$ 0,01b       |
| Fv'/Fm'       | 0    | 0,63 $\pm$ 0,03a           | 0,68 $\pm$ 0,01a              | 0,70 $\pm$ 0,01b       |
|               | 30   | 0,57 $\pm$ 0,02a           | 0,60 $\pm$ 0,03a              | 0,65 $\pm$ 0,00a       |
|               | 60   | 0,55 $\pm$ 0,02a           | 0,58 $\pm$ 0,03a              | 0,64 $\pm$ 0,00b       |
|               | 100  | 0,53 $\pm$ 0,02a           | 0,55 $\pm$ 0,03a              | 0,63 $\pm$ 0,00b       |
|               | 300  | 0,50 $\pm$ 0,03a           | 0,49 $\pm$ 0,02a              | 0,64 $\pm$ 0,01b       |
|               | 600  | 0,44 $\pm$ 0,02a           | 0,42 $\pm$ 0,03a              | 0,60 $\pm$ 0,00b       |
|               | 1200 | 0,34 $\pm$ 0,01a           | 0,34 $\pm$ 0,02a              | 0,50 $\pm$ 0,01b       |
|               | 2000 | 0,27 $\pm$ 0,00a           | 0,27 $\pm$ 0,02a              | 0,43 $\pm$ 0,01b       |
| qP            | 0    | 1,05 $\pm$ 0,00a           | 1,02 $\pm$ 0,00b              | 1,08 $\pm$ 0,01c       |
|               | 30   | 1,04 $\pm$ 0,01a           | 0,91 $\pm$ 0,02b              | 1,04 $\pm$ 0,01a       |
|               | 60   | 1,06 $\pm$ 0,01a           | 0,91 $\pm$ 0,01b              | 1,03 $\pm$ 0,01a       |
|               | 100  | 1,05 $\pm$ 0,01a           | 0,89 $\pm$ 0,02b              | 0,99 $\pm$ 0,00c       |
|               | 300  | 0,98 $\pm$ 0,01a           | 0,85 $\pm$ 0,01b              | 0,90 $\pm$ 0,01c       |
|               | 600  | 0,88 $\pm$ 0,01a           | 0,78 $\pm$ 0,01b              | 0,80 $\pm$ 0,02b       |
|               | 1200 | 0,70 $\pm$ 0,01a           | 0,62 $\pm$ 0,02b              | 0,62 $\pm$ 0,03b       |
|               | 2000 | 0,49 $\pm$ 0,02a           | 0,43 $\pm$ 0,02b              | 0,40 $\pm$ 0,03b       |

Tabla S2: tratamiento estadístico de la composición isotópica del  $^{13}\text{C}$  en el  $\text{CO}_2$  respirado por distintos órganos de la planta. Los datos representan la media  $\pm$  ES de cuatro réplicas ( $n= 4$ ). Letras mayúsculas indican diferencia entre especies y letras minúsculas diferencias significativas ( $P=0,05$ ) entre órganos dentro la misma especie.

| Tiempo | Órganos | Especies                   |                               |                        |
|--------|---------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|
|        |         | <i>Panicum virgatum</i> L. | <i>Miscanthus x giganteus</i> | <i>Arundo donax</i> L. |
| T0     | Hoja    | -8,51 $\pm$ 0,47Aa         | -10,66 $\pm$ 0,53Aa           | -21,48 $\pm$ 0,64Ba    |
| T0     | Raíz    | -12,12 $\pm$ 0,22Ab        | -11,06 $\pm$ 0,25Aa           | -20,66 $\pm$ 0,62Ba    |
| T0     | Rizoma  | -13,14 $\pm$ 0,41Ab        | -12,05 $\pm$ 0,45Aa           | -26,01 $\pm$ 0,40Bb    |
| T1     | Hoja    | 22,15 $\pm$ 1,51Aa         | 26,03 $\pm$ 2,65Aa            | 2,32 $\pm$ 4,09Ba      |
| T1     | Raíz    | 61,25 $\pm$ 8,03Ab         | 38,16 $\pm$ 8,59Ba            | 29,47 $\pm$ 4,39Bb     |
| T1     | Rizoma  | 118,80 $\pm$ 9,16Ac        | 72,86 $\pm$ 10,53Bb           | 37,96 $\pm$ 2,45Cc     |
| T2     | Hoja    | -5,24 $\pm$ 0,60Aa         | -9,51 $\pm$ 0,8B7a            | -13,42 $\pm$ 0,25Ca    |
| T2     | Raíz    | 6,72 $\pm$ 0,56Ab          | -5,82 $\pm$ 1,52Bb            | -11,27 $\pm$ 0,87Ca    |
| T2     | Rizoma  | 19,91 $\pm$ 2,50Ac         | 6,17 $\pm$ 0,40Bc             | -0,14 $\pm$ 3,04Cb     |

Tabla S3: Tratamiento estadístico de la composición isotópica del  $^{13}\text{C}$  en la MOT de los distintos órganos de la planta. Los datos representan la media  $\pm$  ES de cuatro réplicas ( $n=4$ ). Letras mayúsculas indican diferencia entre especies y letras minúsculas diferencias significativas ( $P=0,05$ ) entre órganos dentro la misma especie.

| Tiempo | Órganos | Especies                   |                               |                        |
|--------|---------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|
|        |         | <i>Panicum virgatum</i> L. | <i>Miscanthus x giganteus</i> | <i>Arundo donax</i> L. |
| T0     | Hoja    | -13,25 $\pm$ 0,09Aa        | -13,15 $\pm$ 0,21Aa           | -32,80 $\pm$ 0,10Ba    |
| T0     | Tallo   | -13,23 $\pm$ 0,14Aa        | -13,19 $\pm$ 0,03Aa           | -32,64 $\pm$ 0,18Ba    |
| T0     | Raíz    | -13,25 $\pm$ 0,25Aa        | -12,85 $\pm$ 0,14Aab          | -31,30 $\pm$ 0,27Bb    |
| T0     | Rizoma  | -12,88 $\pm$ 0,12Aa        | -12,46 $\pm$ 0,15Ab           | -30,42 $\pm$ 0,67Bb    |
| T1     | Hoja    | 7,84 $\pm$ 1,54Aa          | -2,46 $\pm$ 0,99Aa            | 6,46 $\pm$ 1,85Aab     |
| T1     | Tallo   | 29,34 $\pm$ 0,78Ab         | 22,24 $\pm$ 0,90Bb            | 30,50 $\pm$ 3,08Ab     |
| T1     | Raíz    | 9,11 $\pm$ 1,60Ba          | -2,14 $\pm$ 0,37Aa            | -3,67 $\pm$ 0,63Aa     |
| T1     | Rizoma  | 9,30 $\pm$ 0,97Aa          | 3,01 $\pm$ 1,66Ab             | 10,55 $\pm$ 2,83Aab    |
| T2     | Hoja    | -4,48 $\pm$ 0,39Aab        | -9,69 $\pm$ 0,61Ba            | -24,52 $\pm$ 1,70Ca    |
| T2     | Tallo   | -6,22 $\pm$ 0,96Aa         | -9,34 $\pm$ 2,03Aa            | -23,10 $\pm$ 3,90Ba    |
| T2     | Raíz    | -0,66 $\pm$ 1,97Ab         | 2,41 $\pm$ 1,22Ab             | -27,35 $\pm$ 0,77Ba    |
| T2     | Rizoma  | 7,06 $\pm$ 1,19ABc         | 9,03 $\pm$ 1,94Bc             | 2,81 $\pm$ 0,36Ab      |

Tabla S4: Tratamiento estadístico de la composición isotópica del  $^{15}\text{N}$  en la MOT de los distintos órganos de la planta. Los datos representan la media  $\pm$  ES de cuatro réplicas ( $n= 4$ ). Letras mayúsculas indican diferencia entre especies y letras minúsculas diferencias significativas ( $P=0,05$ ) entre órganos dentro la misma especie

| Tiempo | Órganos | Especies                   |                               |                        |
|--------|---------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|
|        |         | <i>Panicum virgatum</i> L. | <i>Miscanthus x giganteus</i> | <i>Arundo donax</i> L. |
| T0     | Hoja    | 4,51 $\pm$ 0,23Aa          | 5,00 $\pm$ 0,77Aa             | 4,00 $\pm$ 0,16Aa      |
| T0     | Tallo   | 4,21 $\pm$ 0,73Aa          | 4,23 $\pm$ 0,29Aa             | 2,33 $\pm$ 0,89Ba      |
| T0     | Raiz    | 2,13 $\pm$ 0,20Ab          | 0,49 $\pm$ 0,22Bb             | 1,37 $\pm$ 0,45Ab      |
| T0     | Rizoma  | 3,15 $\pm$ 0,44Aab         | -1,56 $\pm$ 0,67Bc            | -0,40 $\pm$ 0,35Cc     |
| T1     | Hoja    | 361,30 $\pm$ 100,36Aa      | 44,87 $\pm$ 4,74Ba            | 81,10 $\pm$ 20,75Ca    |
| T1     | Tallo   | 928,54 $\pm$ 201,72Ab      | 217,47 $\pm$ 13,36Bc          | 93,43 $\pm$ 17,16Cab   |
| T1     | Raiz    | 1254,36 $\pm$ 11,49Aa      | 150,42 $\pm$ 13,19Bb          | 78,87 $\pm$ 8,20Cb     |
| T1     | Rizoma  | 651,96 $\pm$ 256,92Ab      | 128,06 $\pm$ 21,43Bb          | 44,01 $\pm$ 5,29Cc     |
| T2     | Hoja    | 701,52 $\pm$ 113,58Aa      | 43,06 $\pm$ 9,93Ba            | 83,41 $\pm$ 19,21Ca    |
| T2     | Tallo   | 641,16 $\pm$ 48,90Aa       | 130,11 $\pm$ 22,12Bb          | 67,54 $\pm$ 8,47Cb     |
| T2     | Raiz    | 711,09 $\pm$ 181,20Aa      | 114,79 $\pm$ 31,71Bc          | 67,30 $\pm$ 24,71Cb    |
| T2     | Rizoma  | 800,56 $\pm$ 145,02Ab      | 150,13 $\pm$ 23,03Bb          | 126,80 $\pm$ 40,19Bc   |