



UNIVERSITAT<sup>DE</sup>  
BARCELONA

## Respuesta de gramíneas perennes frente al estrés para la producción de biomasa

Elena Sánchez Sánchez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

# **RESPUESTA DE GRAMÍNEAS PERENNES FRENTE AL ESTRÉS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA**

Memoria presentada por Elena Sánchez Sánchez para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona. Este trabajo se enmarca dentro del programa de doctorado de "Biología Vegetal" correspondiente al bienio 2011/2015 del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona.

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

Doctoranda

Elena Sánchez Sánchez

Director de Tesis

Dr. Salvador Nogués Mestres

BARCELONA, SEPTIEMBRE DE 2015





*A Íñigo*



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lloc, m'agradaria agrair al Dr. Salvador Nogués Mestres, el meu director de tesi, per haver-me donat l'oportunitat d'integrar-me en el seu equip de treball i poder dur a terme tota aquesta experiència que comporta fer una tesi doctoral. Per tota l'ajuda que m'has ofert i les bones estones que hem passat a les reunions del OPTIMA.

En segundo lugar, a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT), y particularmente al Programa de Formación de Capital Humano Avanzado – Becas Chile Doctorado en el extranjero, convocatoria 2011, por haber confiado y financiado esta investigación.

En tercer lugar a los compañeros de grupo: Salva Aljazairi, Alba Anadón, Carla Minguet, Xavier Serrat y Camilo López, por vuestra ayuda siempre desinteresada, y en especial a Claudia Arias y Gladys Lino, por la amistad creada durante estos años y los buenos momentos vividos trabajando con los Arundos. ¡Muchas gracias chicas! A Sergio Gil, gracias por hacer tan agradable el trabajo en conjunto.

A todos los profesores de la Unidad y a los compañeros Marta Renato, Jordi Fernández, Sean Mehan, Tana Jubany, Marta Pintó, Ruth Sánchez e Iker Hernández, siempre estabais con una sonrisa en la boca y palabras de ánimo al entrar al despacho o cada vez que nos encontrábamos en los pasillos.

A los miembros del proyecto OPTIMA (Optimization of Perennial Grasses for Biomass Production in Mediterranean Area) por toda la ayuda recibida y los consejos a la hora de afrontar los experimentos. En especial a Danilo Scordia y al resto de becarios Ángel Cordero, Antonia Romero, Evangelia Stravidou y Rita Melis, por los bien que lo hemos pasado en todas las reuniones del OPTIMA en Catania, Madrid y Dublín.

A Ricardo Simonneau, Josep Matas y Javier García de los Servicios de Campos Experimentales. Muchísimas gracias por vuestra ayuda siempre que la pedía (y muchas veces sin pedirla) y los buenos consejos para llevar a cabo los experimentos. A Pilar Teixidó y Pilar Rubio, de los Servicios Científico Técnico, muchas gracias por compartir conmigo vuestros conocimientos de isótopos, ayudarme con las muestras y hacer más agradable los eternos ratos pasando gases por la IRMS.

A Esther Carbó, Marga Montejo y Carmen Cañueto, gracias por vuestra ayuda, tanto administrativa como técnica, en todo momento.

A los amigos de aquí y de allá. A los de Barcelona: Daniela y David, Macarena y Renata, Iris y Guillem, Klaus y Lorena, Abel, María José y Aurora, Cristian; a las chicas de Azagra: Luisa, Esther, María, Sara, Vanesa, Ana, Estefanía y Rebeca; A los de Chile: Pili, Dani y Javier, Carla, Felipe y Domingo, René y Rosa, Diego y a todos los que están repartidos por el mundo, que son muchos, pero todos tenéis un huequito en mi corazón. Muchas gracias por los años de amistad y los buenos ratos vividos.

A Joaquín, Ismael, Joan Manuel, Ludwing, Wolfgang Amadeus, y tantos otros que me habéis acompañado con vuestra música durante las muchas horas de trabajo. Gracias por la inspiración.

A mi familia: a mis tías y primos, a mis hermanas, Cristina y María, a mis sobrinos Pablo, Nicolás, Miguel y Martín, a mis cuñados, Francisco y Álvaro, gracias por hacerme sentir en casa cada vez que hablo con vosotros aunque esté a cientos o miles de kilómetros. A mi abuela, porque a sus 90 años sigue enseñándome algo nuevo cada día y me ha hecho ver que todo se puede conseguir con esfuerzo y trabajo.

A mis padres, Miguel y Mari, que aunque creo que no tienen muy claro qué es lo que hago siempre están dispuestos a ayudar en todo lo que sea posible. Gracias por todo.

A Pablo, por siempre estar ahí, por tu apoyo y tus palabras de ánimo en cada momento, por tu compañía y por hacer que “en la calle, codo a codo, seamos mucho más que dos”. Muchas gracias.

A Íñigo, quien es sin duda lo que mejor me ha pasado en la vida, gracias por elegirnos como padres, nos haces felices cada segundo que estás con nosotros. Perdona las largas horas en las que estuviste en mi barriga redactando la Tesis y el menor tiempo que te he podido dedicar estos últimos meses, te prometo que lo vamos a recuperar. Y recuerda siempre: “Sonríe, que la vida vuela”.



# ÍNDICE



ÍNDICE .....	9
ABBREVIATIONS .....	21
INTRODUCCIÓN .....	27
1.1.- El Cambio Climático .....	29
1.1.1.- ¿Qué es el Cambio Climático?.....	29
1.1.2.- Problemática del Cambio Climático.....	29
1.1.3.- Situación actual y proyecciones de futuro.....	31
1.1.4.- Posibles soluciones frente al Cambio Climático.....	34
1.2.- Las energías renovables.....	35
1.2.1.- ¿Qué son las energías renovables? Tipos de energía renovable .....	35
1.2.2.- Políticas europeas y españolas sobre energía renovable.....	36
1.3.- La bioenergía como fuente de energía renovable .....	37
1.3.1.- La biomasa y tipos de biomasa .....	38
1.3.2.- Especies vegetales utilizadas como fuente de biomasa .....	41
1.3.3.- Las gramíneas perennes.....	41
1.4.- Especies de gramíneas perennes e importancia ecológica .....	42
1.4.1.- <i>Arundo donax</i> L.....	42
1.4.2.- <i>Panicum virgatum</i> L. ....	43
1.4.3.- Otras especies vegetales .....	44
1.4.4.- Importancia ecológica: Tierras marginales.....	44
1.5.- Características y diferencias de las especies C <sub>3</sub> y C <sub>4</sub> .....	45
1.6.- Estreses ambientales.....	48
1.6.1.- Estrés hídrico .....	50
1.6.2.- Estrés salino.....	52
1.6.3.- Estrés por baja temperatura y oscuridad .....	54
1.7.- Los isótopos estables en ecofisiología .....	55
OBJETIVOS.....	61

MATERIALS AND METHODS.....	65
3.1.- Plant material.....	67
3.2.- Experimental design.....	69
3.2.1.- Experiment I: "Salinity and water stress effects on biomass production in different <i>Arundo donax</i> L. clones".....	69
3.2.1.1.- Experiment Ia: Screening for salinity and water stress (UB) .....	69
3.2.1.2.- Experiment Ib: Screening for increasing salinity levels (UB and UNICT)...	70
3.2.2.- Experiment II: "The response of <i>Arundo donax</i> L. (C <sub>3</sub> ) and <i>Panicum virgatum</i> L. (C <sub>4</sub> ) to different stresses" .....	71
3.2.2.1.- Experiment IIa: Water stress and salinity .....	72
3.2.2.2.- Experiment IIb: Temperature and continuous dark stress .....	73
3.2.3.- Experiment III: " <sup>13</sup> C and <sup>15</sup> N isotope labelling to study the response of two perennial grasses ( <i>Arundo donax</i> L. and <i>Panicum virgatum</i> L.) to water stress" .....	74
3.3.- Methods .....	75
3.3.1.- Physiological measurements (Exp. I, II and III).....	75
3.3.1.1.- Gas exchange (Exp. I, II and III) and fluorescence parameters (Exp. II and III).....	75
3.3.1.2.- Relative water content (RWC; Exp. I, II and III).....	77
3.3.1.3.- Chlorophyll content (Exp. I and II).....	77
3.3.1.4.- O <sub>2</sub> consumption, CO <sub>2</sub> production and respiratory quotient (RQ; Exp. IIb)77	
3.3.2.- Biomass parameters (Exp. I, II and III).....	78
3.3.3.- Stress susceptibility index (SSI; Exp. Ia and Ib).....	79
3.3.4.- Isotope determinations (Exp. III).....	80
3.3.4.1.- <sup>13</sup> C and <sup>15</sup> N labelling procedures .....	80
3.3.4.2.- δ <sup>13</sup> C and δ <sup>15</sup> N of total organic matter (δ <sup>13</sup> C <sub>TOM</sub> and δ <sup>15</sup> N <sub>TOM</sub> ) and total C and N content (C <sub>c</sub> and N <sub>c</sub> ).....	81
3.3.4.3.- δ <sup>13</sup> C determination of total soluble carbohydrates sugars (δ <sup>13</sup> C <sub>TSS</sub> ).....	81
3.3.4.4.- R <sub>d</sub> and δ <sup>13</sup> C of dark-respired CO <sub>2</sub> determination (δ <sup>13</sup> C <sub>R</sub> ).....	82
3.3.4.5.- Calculations.....	82

3.4.- Statistics .....	83
RESULTS.....	85
4.1.- Experiment I: "Salinity and water stress effects on biomass production in different <i>Arundo donax</i> L. clones" .....	87
4.1.1.- Experiment Ia: Screening for salinity and water stress (UB) .....	87
4.1.1.1.- Gas exchange .....	87
4.1.1.2.- Relative water content (RWC) .....	90
4.1.1.3.- Chlorophyll content .....	92
4.1.1.4.- Biomass parameters.....	92
4.1.2.- Experiment Ib: Screening for increasing salinity levels (UB, UNICT) .....	97
4.1.2.1.- Gas exchange .....	97
4.1.2.2.- Chlorophyll content .....	100
4.1.2.3.- Biomass parameters.....	100
4.1.3.- Stress susceptibility index (SSI; Exp. Ia y Ib).....	103
4.2.- Experiment II: "The response of <i>Arundo donax</i> L. (C <sub>3</sub> ) and <i>Panicum virgatum</i> L. (C <sub>4</sub> ) to different stresses" .....	105
4.2.1.- Experiment IIa: Water stress and salinity.....	105
4.2.1.1.- Gas exchange .....	105
4.2.1.2.- Relative water content (RWC) .....	108
4.2.1.3.- Chlorophyll content .....	109
4.2.1.4.- Biomass parameters.....	109
4.2.2.- Experiment IIb: Temperature and continuous dark stress.....	112
4.2.2.1.- Gas exchange and fluorescence parameters.....	112
4.2.2.2.- O <sub>2</sub> consumption, CO <sub>2</sub> production and the respiratory quotient (RQ).....	116
4.3.- Experiment III: " <sup>13</sup> C and <sup>15</sup> N isotope labelling to study the response of two perennial grasses ( <i>A. donax</i> L. and <i>P. virgatum</i> L.) to water stress" .....	117
4.3.1.- Gas exchange and fluorescence .....	117
4.3.2.- RWC .....	121

4.3.3.- Biomass parameters .....	121
4.3.4.- $\delta^{13}\text{C}$ of total organic matter ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$ ) and total C content ( $C_c$ ) .....	126
4.3.5.- $\delta^{13}\text{C}$ of Total Soluble Sugars ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{TSS}}$ ).....	128
4.3.6.- $\delta^{13}\text{C}$ of dark-respired CO <sub>2</sub> determination ( $\delta^{13}\text{C}_R$ ) and $R_d$ .....	130
4.3.7.- $\delta^{15}\text{N}$ of total organic matter ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{TOM}}$ ) and total ( $N_c$ ) .....	132
RESUMEN DE MATERIALES Y MÉTODOS Y RESULTADOS.....	135
DISCUSIÓN .....	149
5.1.- Respuesta de las gramíneas perennes en condiciones control.....	151
5.2.- Respuesta de las gramíneas perennes en condiciones de estrés .....	154
5.2.1.- Respuesta al estrés hídrico .....	155
5.2.2.- Respuesta al estrés salino .....	160
5.2.3.- Respuesta a la combinación de estrés salino y estrés hídrico .....	163
5.2.4.- Uso de índices de susceptibilidad al estrés.....	164
5.2.5.- Respuesta al estrés por baja temperatura y oscuridad continua.....	165
5.3.- Resultados del uso de isótopos estables en ecofisiología.....	168
5.3.1.- Uso de isótopos estables como marcadores de los metabolismos de C y N.....	169
5.3.1.1.- Isótopos estables de C.....	169
5.3.1.2.- Isótopos estables de N .....	171
5.3.2.- Uso de isótopos estables como medidores de estrés.....	172
CONCLUSIONES.....	175
REFERENCIAS .....	179
SUPPLEMENTARY MATERIAL .....	197
Experiment I: "Salinity and water stress effects on biomass production in different <i>Arundo donax</i> L. clones" .....	199
Experiment II: "The response of <i>Arundo donax</i> L. (C <sub>3</sub> ) and <i>Panicum virgatum</i> L. (C <sub>4</sub> ) to different stresses" .....	202

Experiment III: "<sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N isotope labelling to study the response of two perennial grasses (*Arundo donax* L. and *Panicum virgatum* L.) to water stress" ..... 206



**INDICE DE FIGURAS**

**Fig. 1.1.1.-** Representación del sistema climático de la Tierra. .... 30

**Fig. 1.1.2.-** Tabla resumen de los indicadores de Cambio Climático ..... 31

**Fig. 1.1.3.-** Cambios globales observados en la concentración de CO<sub>2</sub> y en la temperatura. .... 32

**Fig. 1.1.4.-** Modelo de la media anual de los cambios proyectados para el periodo 2016-2035 con respecto a la evaporación menos precipitación y la humedad del suelo a los 10 cm de la superficie. .... 33

**Fig. 1.2.1.-** Producción interior de energía primaria y consumo de energía final en España (2013). .... 37

**Fig. 1.3.1.-** Vista esquemática de la variedad de rutas bioenergéticas tanto comerciales como en desarrollo 39

**Fig. 1.5.1.-** Esquema simplificado de las rutas metabólicas de fijación del carbono de las especies C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>. 47

**Fig. 1.6.1.-** Esquema de las acciones llevadas a cabo por la planta en reacción a las condiciones ambientales adversas. .... 50

**Fig. 1.6.2.-** Esquema de las dos fases de respuesta a la salinidad de las plantas. .... 53

**Fig. 3.2.1.-** Scheme of the experimental design of experiment Ia..... 69

**Fig. 3.2.2.-** Scheme of the experimental design of experiment Ib. .... 71

**Fig. 3.2.3.-** Scheme of the experimental design of experiment IIa..... 72

**Fig. 3.2.4.-** Scheme of the experimental design of experiment IIb. .... 73

**Fig. 3.2.5.-** Scheme of the experimental design of experiment III..... 74

**Fig. 4.1.1.-** Changes in A<sub>sat</sub> and g<sub>s</sub> during T0, T15, T30, T45 and T60 in each clone, respectively for each treatment (WW S-, WS S-, WW S+ and WS S+). .... 89

**Fig. 4.1.2.-** Changes in RWC during T15, T30 and T60 in each clone for each treatment (WW S- (a); WS S- (b); WW S+ (c) and WS S+ (d)). .... 91

**Fig. 4.1.3.-** Changes in TDW at T60 in each clone for each treatment (WW S-, WS S-, WW S+ and WS S+). . 94

**Fig. 4.1.4a.-** Changes in A<sub>sat</sub> and g<sub>s</sub> during Ti and Tf in each clone, respectively for each treatment (UNICT S0 and UNICT S4).. .... 98

**Fig. 4.1.4b.-** Changes in A<sub>sat</sub> and g<sub>s</sub> at UB during Ti and Tf in each clone, respectively for each treatment (UB S0 and UB S16). .... 99

**Fig. 4.1.5a.-** Differences in g<sub>LA</sub>, TDW, S/R and SLA at T60 in each clone at UNICT for each treatment (S0 and S4). .... 102

**Fig. 4.1.5b.-** Differences in g<sub>LA</sub>, TDW, S/R and SLA at T60 in each clone at UB for each treatment (S0 and S16). .... 102

**Fig. 4.1.6.-** 3-D graphic representing stress susceptibility index (SSI) of each clone according to water stress (WS; X axis), salinity (S; Y axis) and both stresses (WSS; Z axis).. .... 103

<b>Fig. 4.2.1.-</b> Representation of $A_{sat}$ , $g_s$ and WUE of <i>A. donax</i> L. and <i>P. Virgatum</i> L. during the Exp. IIa (T0, T15, T30, T45, T60) for each treatment: i) well-watered without salinity (WW S-); ii) low watered without salinity (WS S-); iii) well-watered with salinity (WW S+) and iv) low watered with salinity (WS S+).	107
<b>Fig. 4.2.2.-</b> Changes in relative water content (RWC, %) between T0 and T60 for both species and treatments (WW S-, WS S-, WW S+ and WS S+).	108
<b>Fig. 4.3.1.-</b> Photosynthesis parameters in both species ( <i>A. donax</i> L. and <i>P. virgatum</i> L.) for each treatment: i) Control (C), ii) Mild stress (MS) and iii) Severe Stress (SS) at Tf.	119
<b>Fig. 4.3.2.-</b> Fluorescence parameters for each treatment: i) Control (C), ii) Mild Stress (MS) and iii) Severe Stress (SS) at Tf.	121
<b>Fig. 4.3.3.-</b> Changes in RWC in both species ( <i>A. donax</i> L. and <i>P. virgatum</i> L.) for each treatment: i) Control (C), ii) Mild Stress (MS) and iii) Severe Stress (SS) at Tf.	121
<b>Fig. 4.3.4.-</b> Effect of stress in biomass parameters (LA, S/R and TDW,) in both species ( <i>A. donax</i> L. and <i>P. virgatum</i> L.) for each treatment: i) Control (C), ii) Mild Stress (MS) and iii) Severe Stress (SS) at Tf.	125
<b>Fig. 4.3.5.-</b> Water stress effects on $\delta^{13}C$ values of $CO_2$ in total organic matter ( $\delta^{13}C_{TOM}$ ) in leaves, stems, roots and rhizomes in both species ( <i>A. donax</i> L. (a) and <i>P. virgatum</i> L. (b)) at T0, T1 and T2.	127
<b>Fig. 4.3.6.-</b> Water stress effects on $\delta^{13}C$ values of sugars ( $\delta^{13}C_{TSS}$ ) in leaves, stems, roots and rhizomes in both species ( <i>A. donax</i> L. (a) and <i>P. virgatum</i> L. (b)) at T0, T1 and T2.	129
<b>Fig. 4.3.7.-</b> Water stress effects on $\delta^{13}C$ values of respired $CO_2$ ( $\delta^{13}C_R$ ) in leaves, stems, roots and rhizomes in both species ( <i>A. donax</i> L. (a) and <i>P. virgatum</i> L. (b)) at T0, T1 and T2.	131
<b>Fig. 4.3.8.-</b> Water stress effects on $\delta^{15}N$ values of $N_2$ in total organic matter ( $\delta^{15}N_{TOM}$ ) in leaves, stems, roots and rhizomes in both species ( <i>A. donax</i> L. (a) and <i>P. virgatum</i> L. (b)) at T0, T1 and T2.	133
<b>SM 1.2.-</b> Changes in chlorophyll content between T0 (grey bars) and T60 for each clone and treatment (WW S-, WS S-, WW S+ and WS S+).	199
<b>SM 1.4.-</b> Changes in chlorophyll content (SPAD units) in each clone at Tf, respectively for each treatment: a) UNICT S0 and UNICT S4; b) UB S0 and UB S16.	200
<b>SM 1.5.-</b> Principal component analysis (PCA) and variance (%) of each component. The most significant and positive parameters of component 1 (above 0.750) were selected.	201
<b>SM 1.6.-</b> 2-D graphic representing stress susceptibility index (SSI) of each clone according to UNICT S4 (X axis) and UB S16 (Y axis).	201
<b>SM 2.2.-</b> Bivariate correlations between $A_{sat}$ and $g_s$ for each treatment: i) well watered with non-saline solution (WW S-; a), ii) water stress with non-saline solution (WS S-; b), ii) well watered with saline solution (WW S+; c) and iv) water stress with saline solution (WS S+; d) during the experiment (T0 - T60).	203
<b>SM 2.3.-</b> Changes in chlorophyll content (SPAD units) between T0 and T60 for both species and treatments (WW S-, WS S-, WW S+ and WS S+) in Exp. IIa.	204
<b>SM 2.4.-</b> Mitochondrial respiration rates of <i>A. donax</i> L. and <i>P. virgatum</i> L. under AD (a,c) and CD (b,d) and recovery (R) of Exp. IIb.	205

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.3.1.-</b> Tabla comparativa de la materia prima, tecnología, desventajas y ventajas de los combustibles fósiles, de los biocombustibles de 1ª, 2ª y 3ª generación. ....	40
<b>Tabla 1.5.1.-</b> Diferencias morfológicas y fisiológicas de las especies C <sub>3</sub> y C <sub>4</sub> .....	48
<b>Tabla 1.7.1.-</b> Isótopos estables y abundancia relativa .....	56
<b>Table 3.1.1.-</b> Summary about the experimental design: experimental conditions, plant material, treatments and analysis.....	67
<b>Table 3.1.2.-</b> Name, place of collection and additional information about the clones of <i>A. donax</i> L. used in experiments Ia y Ib, II and III.....	68
<b>Table 4.1.1.-</b> Biomass parameters in 8 clones of <i>A. donax</i> L. under four different treatments: (i) well-watered with non-saline solution (WW S-), (ii) low watered with non-saline solution (WS S-), (iii) well-watered with saline solution (WW S+) and iv) low watered with saline solution (WS S+) at T60.....	93
<b>Table 4.1.2.-</b> Biomass parameters in 8 clones of <i>Arundo donax</i> L. under four different treatments: (i) well-watered with non-saline solution (WW S-), (ii) low watered with non-saline solution (WS S-), (iii) well-watered with saline solution (WW S+) and iv) low watered with saline solution (WS S+) at T60.....	96
<b>Table 4.2.1.-</b> Biomass parameters in <i>A. donax</i> L. (A) and <i>P. virgatum</i> L. (B) under four different treatments at the end of the experiment (T60): i) well watered without salinity (WW S-); ii) water stress without salinity (WS S-); iii) well watered with salinity (WW S+) and iv) water stress with salinity (WS S+).....	111
<b>Table 4.2.2.-</b> Photosynthesis parameters of <i>A. donax</i> L. (A) and <i>P. virgatum</i> L. (B) under three different treatments: i) Control conditions; ii) ambient temperature and darkness (AD); iii) cold temperature and darkness (CD).....	113
<b>Table 4.2.3.-</b> Fluorescence parameters of <i>A. donax</i> L. (A) and <i>P. virgatum</i> L. (B) under three different treatments: i) Control conditions; ii) ambient temperature and darkness (AD); iii) cold temperature and darkness (CD).....	115
<b>Table 4.2.4.-</b> Representation of O <sub>2</sub> consumption (μmol O <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ), CO <sub>2</sub> production (μmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) and respiratory quotient (RQ) of <i>A. donax</i> and <i>P. virgatum</i> under three different treatments: i) Control; ii) Ambient temperature and continuous darkness and iii) Cold temperature and continuous darkness in experiment IIb at 9d.....	117
<b>Table 4.3.1.-</b> Changes in biomass parameters ( <i>H</i> , height (cm); NS, number of stems; NGL, number of green leaves) in both species ( <i>A. donax</i> L. and <i>P. virgatum</i> L.) for each treatment: i) Control (C), ii) Mild stress (MS) and iii) Severe Stress (SS) between T <sub>i</sub> and T <sub>f</sub> . ....	123
<b>SM 1.1.-</b> Correlation values and significant differences between A <sub>sat</sub> , g <sub>s</sub> and time for the eight clones of <i>A. donax</i> L. for each treatment.....	199
<b>SM 1.3.-</b> Correlation values and significant differences between A <sub>sat</sub> , SPAD, SLA and (TDW for the 8 clones of <i>A. donax</i> .....	200
<b>SM 2.1.-</b> Comparison of photosynthesis (a) and fluorescence parameters (b) of <i>A. donax</i> L. and <i>P. virgatum</i> L. at the beginning of experiment IIa (T <sub>0</sub> ). ....	202
<b>SM 3.1.-</b> Photosynthesis parameters (a) and fluorescence parameters (b) at T <sub>i</sub> in both species ( <i>A. donax</i> L. and <i>P. virgatum</i> L.).....	206

**SM 3.2.-** Biomass parameters in both species (*A. donax* L. and *P. virgatum* L.) for each treatment: (i) Control (C), (ii) Mild stress (MS) and (iii) Severe Stress (SS) at Tf. .... 207

**SM 3.3.-** Values of dark respiration ( $R_d$ ), C content ( $C_c$ ), N content ( $N_c$ ), and  $C_c/N_c$  ratio in both species (*A. donax* L. and *P. virgatum* L.) for each treatment: (i) Control (C), (ii) Mild stress (MS) and (iii) Severe Stress (SS) at Tf. .... 208

**SM 3.4.-** Statistical analysis of water stress effects on  $\delta^{13}C_R$ ,  $\delta^{13}C_{TOM}$ ,  $\delta^{15}N_{TOM}$  and  $\delta^{13}C_{TSS}$  ..... 209

## **ABBREVIATIONS**



$A_{\text{sat}}$	Light saturated rate of net carbon assimilation ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
$A_{\text{max}}$	Maximum photosynthesis rate ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
ABA	Abscisic acid
ANOVA	Analysis of variance
C	Carbon
$C_c$	Carbon content (%C $\text{mg}^{-1}$ )
$C_c/N_c$	Carbon/Nitrogen ratio
CAM	Crassulacean acid metabolism
$C_3$	$C_3$ carbon fixation
$C_4$	$C_4$ carbon fixation
$c_i$	Leaf intercellular $\text{CO}_2$ concentration
DLP	Dry Leave Percentage (%)
DW	Dry Weight (g)
$F_v/F_m$	Maximum yield of PSII
$F_v'/F_m'$	Efficiency of excitation energy capture by open PSII reaction centres
FW	Fresh Weight (g)
$g_s$	Stomatal conductance ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
gLA	Green Leaf Area ( $\text{m}^2$ )
GLP	Green Leave Percentage (%)
H	Hydrogen
$H$	Height (cm)
HCl	Hydrochloric acid
$iWUE$	Instantaneous Water Use Efficiency ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ )
$J_{\text{max}}$	Maximum electron transport rate contributing to RuBP regeneration ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
$l$	Stomatal limitation (%)
LA	Leaf Area ( $\text{cm}^2$ )
LAR	Leaf Area Ratio ( $\text{m}^2 \text{ Kg}^{-1}$ total dry weight)

LMA	Leaf Mass Area (Kg m <sup>-2</sup> )
LT <sub>50</sub>	Lethal temperature at which 50% of the plants die (°C)
LWR	Leaf Weight Ratio (Kg dry leaves Kg <sup>-1</sup> total dry weight)
N	Nitrogen
N <sub>c</sub>	Nitrogen content (%N mg <sup>-1</sup> )
NR	Nitrate Reductase
NAD-ME	Type of C <sub>4</sub> that involve L-aspartate and utilizes and NAD-dependent malic enzyme
NADP-ME	Type of C <sub>4</sub> that not involve L-aspartate and utilizes a NADP-dependent malic enzyme to releases CO <sub>2</sub> from malate
NL	Number of Leaves per plant
NPQ	Non-photochemical quenching
NiR	Nitrite Reductase
NS	Number of stems per plant
NUE	Nitrogen Use Efficiency
O	Oxygen
PAR <sub>i</sub>	Photosynthetically Active Radiation inside the chamber
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Photosynthetic Carbon Reduction
PDB	Pee Dee Belemnite
PDH	Pyruvate Dehydrogenase
PEP	Phosphoenolpyruvic acid
PEP <sub>c</sub>	Phosphoenolpyruvate carboxylase
PEP-CK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PPDK	Pyruvate Phosphate Dikinase
PPFD	Photosynthetic Photon Flux Density
PSII	Photosystem II
q <sub>p</sub>	Photochemical quenching

$R_d$	Dark respiration ( $\mu\text{mol gDW}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )
RQ	Respiratory Quotient
Rubisco	Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase
RuBP	Ribulose-1,5-biphosphate
RWC	Relative water content (%)
S	Salinity
SA	Stem Area ( $\text{m}^2$ )
SE	Standard Error
SLA	Specific Leaf Area ( $\text{m}^2 \text{ Kg}^{-1}$ dry leaves)
SM	Supplementary Material
S/R	Shoot/Root Ratio ( $\text{g g}^{-1}$ )
SSI	Stress Susceptibility Index
$T$	Transpiration ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
TDW	Total Dry Weight (g)
TES	N-tris (hydroxymethyl)methyl-2 aminoethanesulfonic acid
TOM	Total Organic Matter
TSS	Total Soluble Sugars
TW	Total Weight (g)
VPD	Vapor Pressure Deficit (kPa)
$V_{c, \max}$	Maximum carboxylation rate of Rubisco ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
WS	Water Stress
YLP	Yellow Leave Percentage (%)
3-PGA	3-Phosphoglyceric acid
$\phi_{\text{PSII}}$	Relative quantum yield of PSII
$\Psi_w$	Water potential
$\Delta^{13}\text{C}$	Isotopic discrimination of $^{13}\text{C}$
$\delta^{13}\text{C}$	Isotopic composition of $^{13}\text{C}$
$\delta^{15}\text{N}$	Isotopic composition of $^{15}\text{N}$



# INTRODUCCIÓN



## 1.1.- El Cambio Climático

### 1.1.1.- ¿Qué es el Cambio Climático?

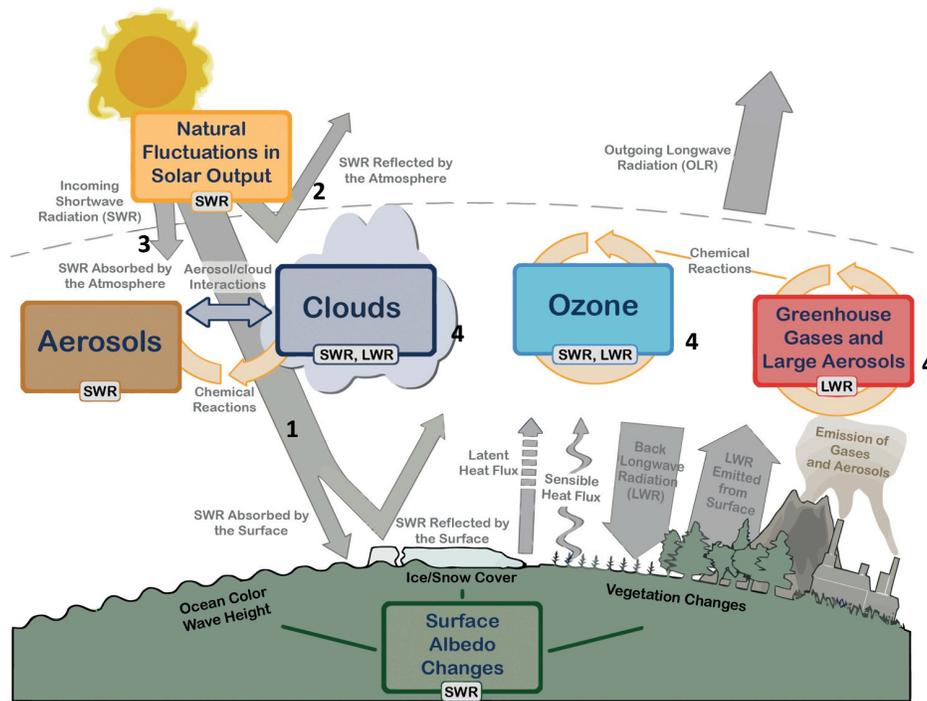
Según el Informe del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC), el término "Cambio Climático" denota un cambio en el estado del clima identificable (por ejemplo, mediante análisis estadísticos) a raíz de una variación en el valor medio y/o en la variabilidad de sus propiedades, y que persiste durante un periodo prolongado (generalmente cifrado en decenios o en periodos más largos; IPCC, 2007). A su vez denota todo cambio del clima a lo largo del tiempo, tanto si es debido a la variabilidad natural como si es consecuencia de la actividad humana.

El IPCC (IPCC, 2013), señala que las actividades humanas continúan afectando al balance energético de la Tierra, variando las emisiones y, por lo tanto, la consiguiente concentración atmosférica de gases y aerosoles radiativamente importante.

### 1.1.2.- Problemática del Cambio Climático

El sistema climático de la Tierra es impulsado por la radiación solar (Fig. 1.1.1). La atmósfera terrestre permite que una parte de la energía solar se acumule en la superficie del planeta, para así calentarlo y hacer posible la vida. Durante muchos siglos, la temperatura de la Tierra ha sido relativamente constante, para lo que es necesario que la energía solar entrante (*Incoming Shortwave Radiation, SWR*) esté en equilibrio con la radiación saliente (*Outcoming Longwave Radiation, OLR*). En la actualidad, de la energía solar entrante (SWR) aproximadamente la mitad es absorbida por la superficie de la tierra (1). El 30% de la fracción de SWR es reflejada de vuelta al espacio por aerosoles, nubes y la superficie de la tierra (albedo; 2), mientras que el 20% restante es absorbido por la atmósfera (3). La mayor parte del flujo de energía de salida de la Tierra está en la parte infrarroja del espectro (*Infrared radiation* o *Longwave Radiation, LWR*). Gran parte de este flujo de energía es absorbida por los componentes de la atmósfera (vapor de agua, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), otros gases de efecto invernadero (GEI) y las nubes, que a su vez emiten LWR en todas las direcciones (4). Parte de estas emisiones son dirigidas hacia la Tierra, aumentando el calor en las capas

inferiores de la atmósfera y de la superficie de la Tierra, fenómeno que se conoce como “Efecto Invernadero”.



**Fig. 1.1.1.-** Representación del sistema climático de la Tierra. (1) El 50% de la energía solar entrante (SWR) es absorbida por la superficie de la tierra. (2) El 30% de SWR es reflejada de vuelta al espacio por aerosoles, nubes y la superficie de la tierra. (3) El 20% restante es absorbido por la atmósfera. (4) La mayor parte del flujo de energía de salida de la Tierra se absorbe por los componentes de la atmósfera (vapor de agua, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O, otros GEI) y las nubes, que a su vez lo emiten en todas las direcciones. La fracción emitida de vuelta hacia la Tierra es la responsable de generar el fenómeno conocido como Efecto Invernadero. Figura modificada del IPCC (2013).

En la actualidad existen muchos indicadores del Cambio Climático, que incluyen respuestas físicas como cambios en la temperatura de la superficie, en las precipitaciones, en la severidad de los eventos climáticos, en los glaciares, en los océanos, en la superficie de hielo y en el nivel del mar, tal y como se ha resumido en la Fig. 1.1.2.

ATMÓSFERA	
Estratosfera	Enfriamiento de la temperatura de la estratosfera Cambios en la fuerza de los vórtices polares en invierno Calentamiento desde la superficie hacia la mayoría de la troposfera
Troposfera	Cambios a largo plazo y a larga escala de la circulación atmosférica Incremento en la concentración de CO <sub>2</sub> y otros GEI debido a la actividad humana Cambios en la carga de aerosoles y la concentración de ozono
Cerca de la superficie	Aumento de la temperatura media global cerca de la superficie Aumento de la humedad de la superficie Aumento de la temperatura de la superficie del mar

OCÉANOS	SUPERFICIE	HIELO
Calentamiento en gran parte de los océanos del mundo Aumento de la tasa de incremento del nivel del mar Cambios en la salinidad del océano Acidificación de los océanos	Mayor frecuencia de días y noches cálidas. Menor frecuencia de días y noches frías Reducción del número de heladas Descenso de la cobertura de nieve en muchas regiones Degradación del permafrost en extensión y grosor Cambios en las precipitaciones a larga escala Incremento en el número de eventos de lluvias torrenciales	Reducción de la media promedio anual de hielo marino en el Ártico Retroceso generalizado de los glaciares Cambios en las capas de hielo en Groenlandia y Antártica

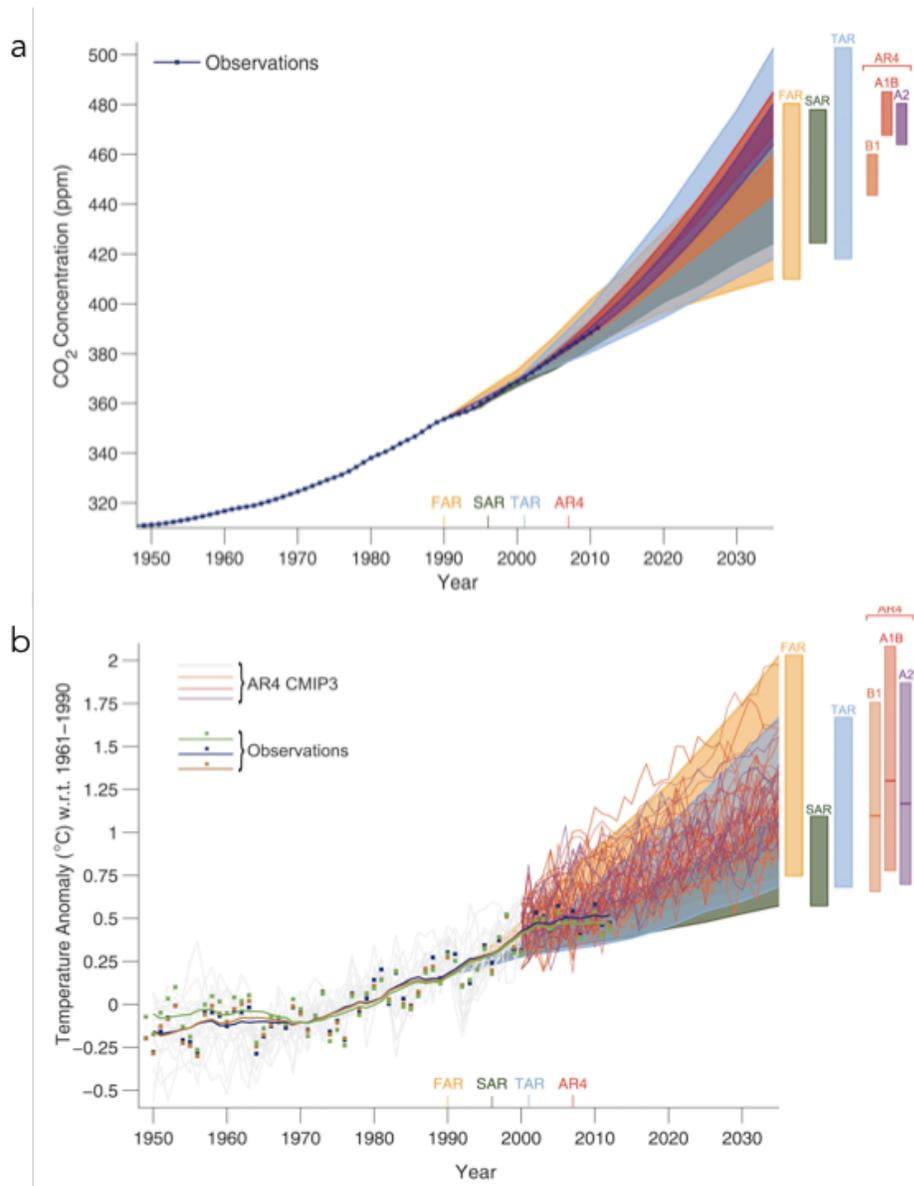
**Fig. 1.1.2.-** Tabla resumen de los indicadores de Cambio Climático observados según el informe AR4 del IPCC. Figura adaptada del IPCC (2013).

### 1.1.3.- Situación actual y proyecciones de futuro

Según el informe del IPCC (IPCC, 2013), la concentración atmosférica de los GEI aumentó en el periodo 2005-2011. La [CO<sub>2</sub>] alcanzó las 390,5 ppm en 2011, un 40% más que en 1750 mientras que la [N<sub>2</sub>O] fue de 324,2 ppb, un 20% más que en ese mismo año. Por otro lado, la [CH<sub>4</sub>] aumentó un 150% desde 1750, alcanzando valores de 1803,2 ppb. Otros gases como hidrofluorocarbonos (HFCs), perfluorocarbonos (PFCs) y hexafluoruro de azufre (SF<sub>6</sub>) han incrementado rápidamente su concentración, pero su contribución al forzamiento radiativo es menor del 1% del total de los GEI. A su vez, la temperatura global del aire sobre la tierra y los océanos ha aumentado aproximadamente en 0.5°C desde 1950.

A pesar de que el informe menciona que las concentraciones de CO<sub>2</sub>, la temperatura promedio a nivel mundial y el aumento del nivel del mar se encuentran dentro del rango de alcance de las proyecciones anteriores del IPCC (Fig. 1.1.3), otros estudios informan que existe un considerable riesgo de que el suministro de alimentos se vea afectado por

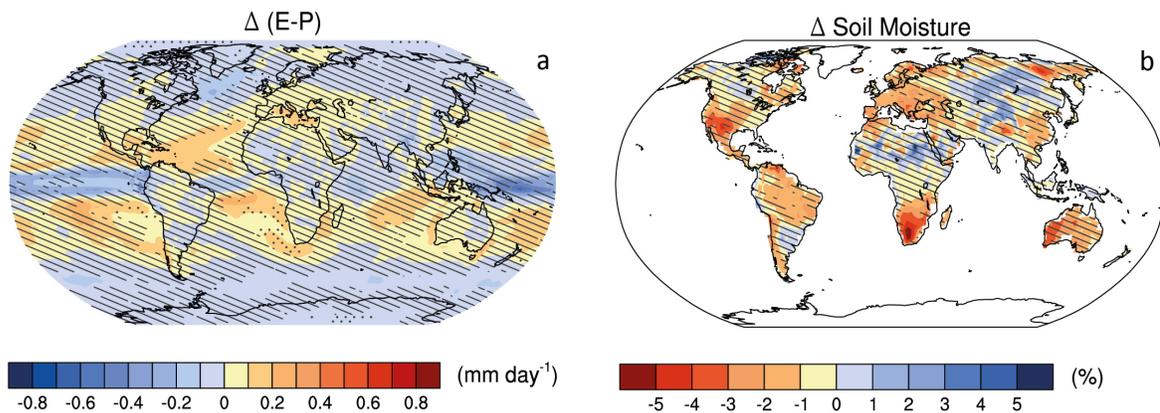
los excesivos incrementos de temperatura en el futuro si las emisiones de CO<sub>2</sub> no son suficientemente reducidas a nivel internacional (Nogués y Azcón-Bieto, 2013; Battisti y Naylor, 2009).



**Fig. 1.1.3.-** Cambios globales observados en la concentración de CO<sub>2</sub> (ppm; a) y en la temperatura (°C; b) desde 1950 comparado con las proyecciones anteriores del IPCC (FAR, 1990; SAR, 1996; TAR, 2001) y del modelo climático (AR4) con tres escenarios (B1, A1B y A2) de 2001 a 2035. Figura obtenida del IPCC (2013).

En relación a la sequía, existen grandes incertidumbres en las proyecciones regionales (Burke y Brown, 2008) y aunque muy pocos estudios se han centrado en los cambios en

un futuro a corto plazo (Sheffield y Wood, 2008; Dai, 2011), según estos mismos autores se esperan incrementos en los fenómenos de sequía. El IPCC (2013) estudió los cambios proyectados en la disponibilidad de agua para el periodo 2016-2035 (Fig. 1.1.4), mostrando como en las altas latitudes y en los trópicos la diferencia entre evaporación (E) y precipitación (P); Fig. 1.1.4a) es, mayoritariamente, negativa debido a los incrementos en la precipitación, mientras que en la zona subtropical se observa un incremento en (E-P), principalmente en Europa y el oeste de Australia y USA. A su vez, se estudiaron los cambios en la humedad del suelo (Fig. 1.1.4b) mostrando descensos en la mayoría de las regiones subtropicales y en Europa central e incrementos en las latitudes del norte.



**Fig. 1.1.4.-** Modelo de la media anual de los cambios proyectados para el periodo 2016-2035 con respecto a la evaporación menos precipitación (E-P; mm día<sup>-1</sup>; a) y la humedad del suelo a los 10 cm de la superficie (%; b). Figura obtenida del IPCC (2013).

Por otro lado, y también como consecuencia de los cambios en la precipitación y evaporación, se esperan cambios en la salinidad de la superficie de los suelos según el IPCC (2013), aumentando en la mayoría de las regiones. Según Várillyay (1994), la acumulación de sales en los suelos, es decir la salinización, es el resultado de la circulación capilar y dispersión de agua salina, debido a una mayor evapotranspiración que la precipitación y el riego. Estas condiciones, generalizadas en las regiones más cálidas y secas del sur de Europa y otras regiones del mundo, se verán exacerbadas por el aumento previsto de temperatura y la disminución de las lluvias. A su vez, el aumento

de la salinidad de los océanos junto con la subida del nivel del mar Mediterráneo (Tsimplis y Rixen, 2002) aumentará la salinidad a lo largo de las regiones costeras.

#### **1.1.4.- Posibles soluciones frente al Cambio Climático**

Los modelos actuales para calcular las proyecciones de temperatura del IPCC concuerdan con la futura dirección del Cambio Climático, pero el tamaño de estos cambios no pueden ser predichos de una forma precisa. La complejidad de la Tierra hace que el futuro clima pueda seguir muy diversos escenarios, por ello es necesario comprenderlos en la actualidad y estar preparados frente a ellos.

En la última Cumbre sobre el Clima (Nueva York, USA, Septiembre de 2014), los Estados Miembros de las Naciones Unidas y representantes de instituciones financieras, empresas y sociedad civil pusieron en evidencia la necesidad de adoptar medidas para reducir las emisiones, fortalecer la resiliencia al Cambio Climático y movilizar la voluntad política, con el fin de limitar a 2°C el aumento de la temperatura del planeta.

Del mismo modo, en la XX Cumbre del Planeta celebrada el pasado mes de Diciembre 2014 en Lima (Perú), donde se reunieron representantes de más de 190 países, se remarcó la necesidad de que todos los países, y no solo los denominados países desarrollados, presenten a Naciones Unidas compromisos cuantificables de reducción de gases de efecto invernadero antes del 1 de Octubre de 2015, con la finalidad de mantener el incremento global medio de temperatura por debajo de los 2°C.

Es necesario remarcar que, junto a los acuerdos internacionales, es de vital importancia concientizar a la sociedad civil sobre la problemática del Cambio Climático, implicándola en el cuidado al medio ambiente y haciéndola participe de las posibles soluciones. Hechos cotidianos como el reciclaje, el ahorro de agua y energía y el uso de energías renovables (entre otros) pueden ayudar, de forma global, a la protección del planeta.

## **1.2.- Las energías renovables**

### **1.2.1.- ¿Qué son las energías renovables? Tipos de energía renovable**

Como se ha comentado en el punto 1.1.4, el desarrollo de fuentes de energía renovables (ER) es uno de los aspectos claves para la mitigación del Cambio Climático. Se denomina ER a aquellas fuentes de energía limpias que tienen un menor impacto ambiental que las fuentes de energía convencionales, y que a su vez pueden ser producidas en un breve periodo de tiempo.

Según el IPCC (2011) las ER son aquellas energías obtenidas a partir de un flujo de energía continuo o repetitivo que ocurre en ambientes naturales, y que incluye fuentes como la biomasa, la energía solar, el calor geotérmico, el poder del agua y de las olas, la energía termal del océano y la energía eólica. Por lo general, estas fuentes de energía se producen a una velocidad igual o mayor a su velocidad de uso.

Según el Ministerio de Industria, Energía y Turismo del Gobierno de España (Gobierno de España, 2014a) y el informe del IPPC relativo a ER (IPCC, 2011), algunos beneficios provenientes del uso de ER son los siguientes:

- Presentan menores emisiones específicas de CO<sub>2</sub> a la atmósfera que los combustibles fósiles, contribuyendo eficientemente a la reducción de las emisiones de GEI.
- Son fuentes de energía inagotables.
- Son fuentes de energía sostenibles. Es decir, su producción no aumenta las emisiones netas de CO<sub>2</sub>, no afecta negativamente a la seguridad alimentaria, no requiere el uso excesivo de agua y/o productos químicos y no amenaza la biodiversidad.
- Una mayor participación de las ER en el balance energético disminuye la dependencia de los combustibles fósiles y diversifica las fuentes de suministros, promoviendo recursos autóctonos.

Según el informe del IPCC (2011), las ER se pueden clasificar según la tecnología utilizada en bioenergía, energía solar directa, energía geotérmica, energía hidroeléctrica, energía oceánica y energía eólica.

Aunque el uso de ER a nivel global es relativamente pequeño su crecimiento se ha acelerado en los últimos años debido a las políticas de los gobiernos, el costo cada vez menor de las tecnologías usadas en ER y el aumento en el precio de los combustibles fósiles (IPCC, 2011).

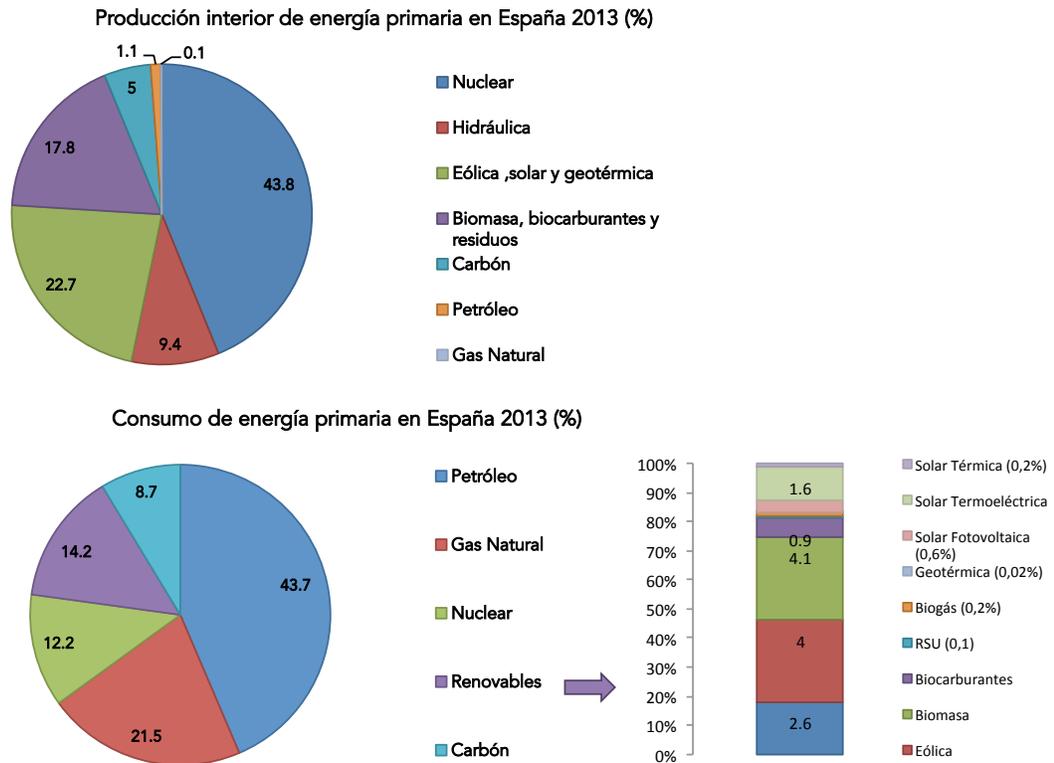
### **1.2.2.- Políticas europeas y españolas sobre energía renovable**

Según las previsiones de la Agencia Internacional de la Energía (AIE), el consumo mundial de energía aumentará alrededor del 40% hasta el año 2030, impulsado fundamentalmente por la creciente demanda de las economías emergentes (especialmente China e India; AIE, 2010).

A nivel europeo, el 23 de abril de 2009 se dictó la Directiva 2009/28/CE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa al fomento del uso de energía procedente de fuentes renovables. En ésta se fijó como objetivos generales conseguir una cuota del 20% de energía procedente de fuentes renovables en el consumo final bruto de energía de la Unión Europea (UE) y una cuota del 10% de energía procedente de fuentes renovables en el consumo de energía en el sector del Estado miembro para el año 2020. Con esos fines, España elaboró y notificó a la Comisión Europea (CE) su Plan de Acción Nacional de Energías Renovables (PANER) para el periodo 2011-2020 (Gobierno de España, 2010).

En general, la demanda final de energía eléctrica ha disminuido un 3,4% en 2013 respecto al año anterior debido a la menor actividad económica derivada de la crisis económica en España (Gobierno de España, 2014b). En relación a las energías renovables, su consumo primario en España ha registrado un crecimiento de un 7,5% en 2013, debido sobre todo al aumento de la generación hidráulica (22,7%) y eólica (9,4%), alcanzando un 14,2% (Gobierno de España, 2014a; Fig. 1.2.1). En contraste, el grupo integrado por la biomasa, el biogás y los biocarburantes han reducido su aportación

respecto a años anteriores debido principalmente a la caída de la demanda de los biocarburantes. Dentro de las energías renovables, la energía eólica, hidráulica y la biomasa cubren el 75% de toda la aportación renovable (Fig. 1.2.1).



**Fig. 1.2.1.-** Producción interior de energía primaria y consumo de energía final en España (2013). Fuente: Gobierno de España (2014b).

### 1.3.- La bioenergía como fuente de energía renovable

La bioenergía tiene un significativo potencial de mitigación de los GEI, ya que los recursos se utilizan de manera sostenible y dentro de sistemas energéticos eficientes. Según el informe del IPCC (2011), los sistemas actuales y futuros de bioenergía (incluyendo los sistemas de cultivo con especies perennes y el uso de residuos y deshechos de biomasa) son capaces de reducir las emisiones entre un 80% y 90% en comparación con la línea base de la energía fósil.

### **1.3.1.- La biomasa y tipos de biomasa**

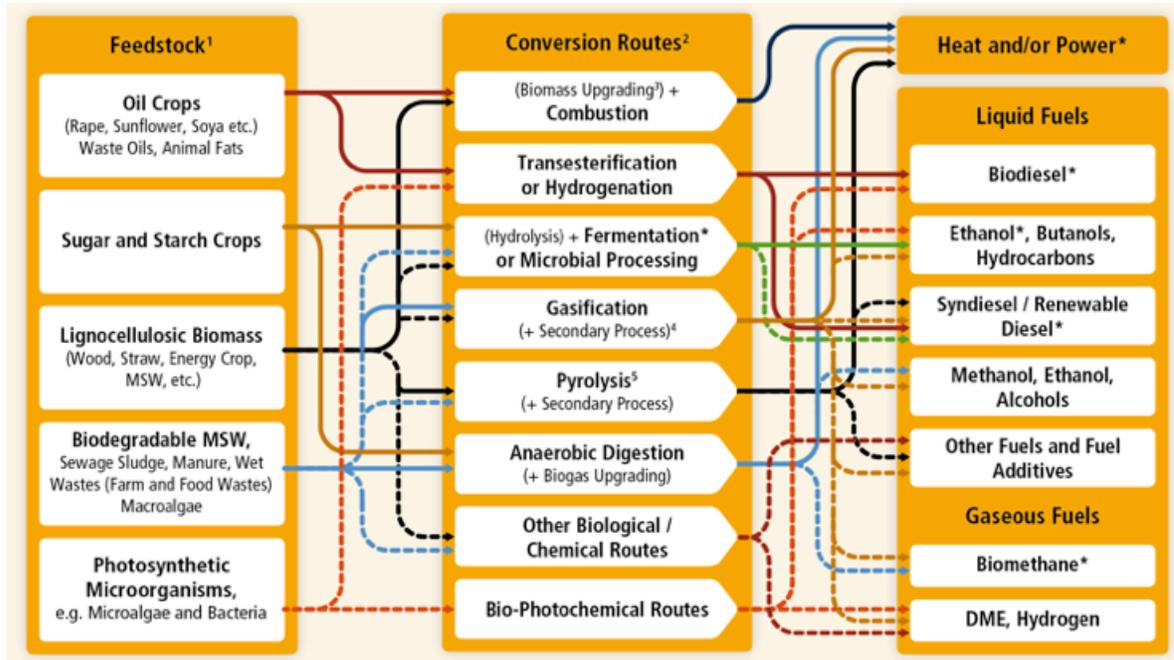
El IPCC (2011) define “biomasa” como una fuente primaria de alimento, forraje y fibra. A su vez destaca que su uso está muy desarrollado debido al uso tradicional de la madera, la paja y el carbón vegetal para cocinar, calentar e iluminar las viviendas de la población más pobre de los países en desarrollo. Esta forma de biomasa tradicional, denominada de baja eficiencia y que, al ser quemada crea graves impactos negativos en la salud y vida de la población, está siendo reemplazada por una biomasa más moderna, denominada de alta eficiencia, que utiliza sólidos, líquidos y gases más convenientes como vectores energéticos secundarios para generar calor, electricidad y energía combinada, así como combustible para el transporte (Fig. 1.3.1).

Podemos clasificar las fuentes de suministro de energía según la siguiente categoría:

- 1) Biocombustibles de primera generación: son aquellos provenientes de la biomasa de cultivos agrícolas destinados a la alimentación humana. El biocombustible se deriva a partir del almidón, azúcar y aceite que proporcionan estos cultivos.
- 2) Biocombustibles de segunda generación: son aquellos provenientes (a) de cultivos energéticos (tanto oleaginosos como lignocelulósicos) y (b) de la biomasa de residuos de la agricultura (como por ejemplo subproductos relacionados con los alimentos y/o forraje o de su procesamiento), de la silvicultura (tanto restos primarios de tala como secundarios de la transformación de la madera), de residuos animales (estiércol) u orgánicos (de hogares y restaurantes),

Es interesante destacar que en el contexto de la producción de biocombustibles, el término “biomasa vegetal” se refiere generalmente al material lignocelulósico, ya que es el que constituye la mayor parte de los materiales no alimentarios de bajo costo económico (Naik y col., 2010).

- 3) Biocombustibles de tercera generación: son aquellos biocombustibles derivados de las algas o bien de organismos modificados genéticamente etc.



**Fig. 1.3.1.-** Vista esquemática de la variedad de rutas bioenergéticas tanto comerciales (líneas continuas) como en desarrollo (líneas discontinuas) que pueden tomar las materias primas según diversas rutas de conversión para generar calor y/o energía (IPCC, 2011).

Aunque los biocombustibles de primera generación pueden ayudar a reducir las emisiones de CO<sub>2</sub> y la dependencia energética de los combustibles fósiles (aunque suelen utilizarse mezclados con combustibles a base de petróleo), existe una preocupación global sobre el abastecimiento de materias primas alimenticias, el cambio de uso de tierra y la competencia con cultivos alimentarios (Naik y col., 2010; Tabla 1.3.1). El debate creado a partir de la competencia entre los alimentos y los combustibles es una de las principales desventajas de los biocombustibles de primera generación, ya que se ha observado un aumento del precio de los alimentos debido al incremento en la producción de estos biocombustibles (HLPE, 2013; Gilbert y Mugerá, 2014). Aun así, todavía existe controversia sobre el alcance de este impacto y su papel en el impulso de la volatilidad del precio (Abbot, 2013).

**Tabla 1.3.1.-** Tabla comparativa de la materia prima, tecnología, desventajas y ventajas de los combustibles fósiles, de los biocombustibles de 1ª, 2ª y 3ª generación. Elaboración propia a partir de la información de Naik y col. (2010) y Schenk y col. (2008).

	<b>Combustibles fósiles</b>	<b>Biocombustibles de 1ª generación</b>	<b>Biocombustibles de 2ª generación</b>	<b>Biocombustibles de 3ª generación</b>
<b>Materia prima</b>	Petróleo	Productos alimenticios (aceites vegetales, maíz, caña de azúcar)	Productos no alimenticios, restos de biomasa.	Algas, organismos modificados genéticamente
<b>Tecnología</b>	Económica			
<b>Desventajas</b>	Disminución de las reservas de petróleo, contaminación ambiental, problemas económicos y ambientales	Materia prima limitada (por la competencia con los alimentos), utilización junto a productos derivados del petróleo	Tecnología en desarrollo para disminuir los costes de producción	Altos costos
<b>Ventajas</b>		Amigable con el medio ambiente, seguridad económica y social	Amigable con el medio ambiente, no compite con productos alimenticios	Amigable con el medio ambiente, altos rendimientos, múltiples a lo largo de un año

Sin embargo, los biocombustibles de segunda generación, contribuyen a la reducción de las emisiones de CO<sub>2</sub> y no compiten con los cultivos destinados a alimentación (Naik y col., 2010; Tabla 1.3.1). Aunque en un principio las algas estaban clasificadas dentro de los biocombustibles de segunda generación, su alto rendimiento energético con menores recursos que otras materias primas hizo que se generara un nuevo grupo de biocombustibles, los de tercera generación (Schenk y col., 2008; Nigam y Singh, 2011). A su vez, la duración del cultivo de algas es mucho menor (1-10 días) que el cultivo de especies vegetales tradicionales (1-2 veces al año), y son capaces de producir entre 15 y 300 veces más de aceite para biodiesel que los cultivos tradicionales, permitiendo múltiples cosechas con rendimientos elevados (Schenk y col., 2008).

### **1.3.2.- Especies vegetales utilizadas como fuente de biomasa**

Dos de las especies vegetales más utilizadas como biocombustibles de primera generación son el maíz (*Zea mays* L.) y la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), seguidas del trigo (*Triticum aestivum* L.) y los aceites de colza (*Brassica napus* L.), soja (*Glycine max* L.) y palma aceitera (*Elaeis guineensis* L.; de Vries y col., 2010). De las materias primas azucaradas o amiláceas se obtiene el bioetanol mientras que el biodiesel se obtiene a partir de las semillas oleaginosas (Naik y col., 2010). Dentro de las especies vegetales utilizadas como biocombustibles de segunda generación se encuentra el cardo (*Cynara cardunculus* L.; Fernández y Curt, 2004; Fernández y col., 2006) y otras todavía en investigación como la patata (*Helianthus tuberosus* L.; Cheng y col., 2009) y el sorgo azucarero (*Sorghum bicolor* L.; Sarath y col., 2008).

Por otro lado, las especies arbóreas forestales más utilizadas en silvicultura para la producción de biocombustibles son el eucalipto (género *Eucalyptus*), el chopo (género *Populus*) y el salix (género *Salix*; Armstrong y col., 1999; Heaton y col., 2004; IEA, 2010), siendo sus ventajas de cultivo el ser especies de crecimiento muy rápido, con una base genética amplia, facilidad para la multiplicación vegetativa y alta capacidad de rebrote (Sixto y col., 2007).

Los cultivos energéticos son aquellos cultivos producidos con el único propósito de usar su biomasa para la generación de energía (Lewandowski y col., 2003). Dentro de los cultivos energéticos nos encontramos las gramíneas perennes.

### **1.3.3.- Las gramíneas perennes**

Las gramíneas perennes han sido ampliamente usadas como cultivos forrajeros por años, contribuyendo a menudo a alimentar a animales utilizados como tracción en granjas y ciudades. Sin embargo, ha sido a partir de los años 80 del siglo pasado cuando se ha incrementado su interés como cultivos energéticos, tanto en Estados Unidos como en Europa (Lewandowski y col., 2003). Según estos autores, además de una reducción de las emisiones antropogénicas de CO<sub>2</sub> al utilizar una menor cantidad de combustibles fósiles, las características que hacen atractivas a estas especies para la producción de biomasa

son su alto potencial de rendimiento y sus altos contenidos en lignina y celulosa en la biomasa. A su vez, el riesgo de erosión se reduce y el contenido de carbón del suelo se incrementa al no necesitar un cultivo con labranza (únicamente antes de la plantación; Ma y col., 1999; Fagnano y col., 2015). Otra de las ventajas de las gramíneas perennes es la baja demanda nutritiva debido al reciclaje de los nutrientes por el rizoma (Christian y col., 1997).

#### **1.4.- Especies de gramíneas perennes e importancia ecológica**

##### **1.4.1.- *Arundo donax* L.**

*Arundo donax* L., también llamado "caña común" o "*giant reed*" en inglés, es una gramínea perenne C<sub>3</sub> perteneciente a la familia de las *Gramineae* (*Poaceae*; Rossa y col., 1998; Lewandowski y col., 2003; Pilu y col., 2012). Aunque no existe un acuerdo sobre el área en la cual se originó, los últimos estudios sugieren que su origen comenzó en Asia y fue propagándose hacia el sur de Europa y África (Lewandowski y col., 2003; Mariani y col., 2010). Aunque *A. donax* L. produce flores, no se han detectado semillas viables debido a los fallos en la división de la célula madre de las megasporas (Mariani y col., 2010; Balogh y col., 2012). Como consecuencia de esto, su propagación y difusión se realiza por fragmentación de los rizomas (Pilu y col., 2013), encontrándose muy poca variabilidad genética entre plantas debido a esta reproducción asexual (Khudamrongsawat y col., 2004; Mariani y col., 2010). Su rápida tasa de crecimiento, su forma de crecimiento y propagación, la tolerancia a ambientes no favorables y suelos infértiles han hecho que *A. donax* L. se haya introducido de forma generalizada en áreas muy diversas, naturalizándose en zonas donde no era una especie nativa (Barney y DiTomaso, 2008; Barney y col., 2009).

*A. donax* L. presenta un alto potencial fotosintético (Rossa y col., 1998) y elevadas tasas de transpiración, por lo que requiere una mayor cantidad de agua para producir la misma cantidad de biomasa que otros cultivos energéticos C<sub>4</sub>, como *Panicum virgatum* L. o *Miscanthus* (*Miscanthus x giganteus*; Nackley y col., 2014; Triana y col., 2015). Aun así, se ha observado como *A. donax* L. ha producido altos y estables rendimientos en biomasa

en experimentos a largo plazo (Angelini y col., 2005; Angelini y col., 2009). Además, estos altos rendimientos se han producido incluso en áreas con condiciones de cultivo no muy adecuadas (ej. sequía, salinidad, entre otros). Según Lewandowski y col. (2003), *A. donax* L. prefiere suelos bien drenados con buen aporte de agua, pero crece también en suelos tanto arcillosos como pedregosos y salinos.

Respecto a la producción de biomasa, Cosentino y col. (2014) observaron como *A. donax* L. produjo desde 11 toneladas de peso seco ha<sup>-1</sup> en condiciones de secano y sin fertilizar hasta 28 toneladas peso seco ha<sup>-1</sup> con un 100% de la restitución máxima de la evapotranspiración y una fertilización de 120 kg N ha<sup>-1</sup>.

#### **1.4.2.- *Panicum virgatum* L.**

*Panicum virgatum* L., también llamado "carrizo" o "switchgrass" en inglés, es una gramínea perenne C<sub>4</sub> nativa de norte América perteneciente a la familia *Gramineae* (*Poaceae*; Lewandowski y col., 2003; Barney y DiTomaso, 2008), ampliamente adaptada a la zona central y este de los Estados Unidos (Lewandowski y col., 2003; Zhang y col., 2011). *P. virgatum* L. puede establecerse por fragmentación de rizomas, al igual que *A. donax* L., y también mediante semillas, por lo que se pueden encontrar varias especies endémicas con distintos grados de adaptación al entorno (Lewandowski y col., 2003). Estos autores han descrito a *P. virgatum* L. como tolerante a la sequía y tolerante moderado a las inundaciones. Según McLaughlin y Walsh (1998) y Lewandowski y col. (2003), la producción de biomasa de *P. virgatum* L. también es elevada, incluso con sequía o baja fertilización del suelo. *P. virgatum* L. se caracteriza por ser una especie cuya enzima málica es dependiente de NAD (NAD-ME; Warner y col., 1987) y cuya utilización neta de los ácidos discarboxílicos ocurre vía el ácido aspártico en las enzimas NAD-málico (ver punto 1.5). *P. virgatum* L. se presenta en dos formas distintas: los denominados ecotipos "lowland", con una maduración más lenta, y los ecotipos "upland", caracterizados por necesitar mayores periodos de crecimiento (Sanderson y col., 1996). Ambas formas son genéticamente diferentes (Porter, 1966), siendo los ecotipos "lowlands" más altos, con hojas más largas, menos tallos por planta y con mayor

diámetro que los “*uplands*”, y son encontrados generalmente en zonas llanas sometidas a inundaciones (Alexopoulou y col., 2008; Cortese y col., 2010).

### **1.4.3.- Otras especies vegetales**

*Miscanthus* spp. y *Phalaris arundinacea* son otras especies de gramíneas perennes utilizadas para biomasa. *Miscanthus* spp. se caracteriza por ser una especie C<sub>4</sub> originaria del sudeste asiático y cultivada en el centro y sur de Europa, mientras que *Phalaris arundinacea* es una especie C<sub>3</sub> nativa del norte Europa (Lewandowski y col., 2003).

Según estos mismos autores, otras especies de gramíneas perennes son *Festuca arundinacea* (C<sub>3</sub>), *Agropyron desertorum* (C<sub>3</sub>), *Cynodon dactylon* (C<sub>4</sub>), *Pennisetum purpureum* (C<sub>4</sub>) y *Sorghum halepense* (C<sub>4</sub>). A su vez, existen varias especies de gramíneas perennes nativas de la zona mediterránea, como son *Ampelodesmos mauritanica*, *Oryzopsis miliacea* L. y *Dactylis glomerata* L. (Nieto y col., 2015).

### **1.4.4.- Importancia ecológica: Tierras marginales**

La creciente demanda de biomasa como fuente de energía renovable está comenzando a generar conflictos, tanto por el uso del suelo (por la controversia entre tierras para la producción de alimentos o para biocombustibles; Baffes y Haniotis, 2010) así como por los efectos del cambio indirecto del uso del suelo (Wiegmann y col., 2008). Aunque hay evidencias que indican que existe suficiente tierra disponible para satisfacer la demanda alimenticia (tanto humana como animal) y bioenergética hasta el 2020 (Renewable Fuels Agency, 2008) es necesario evitar los conflictos mencionados anteriormente. Para ello, se ha sugerido continuar la producción alimentaria en tierras agrícolas productivas y cultivar los cultivos energéticos en las denominadas “tierras marginales” (Renewable Fuels Agency, 2008). Al no existir una única definición de “tierra marginal” podemos entender su significado basándonos en las siguientes definiciones:

- Tierra de baja calidad en relación con el uso agrícola y no apta para la vivienda u otros usos (OECD, 1997).
- Tierra que no es adecuada para la producción alimenticia

- Tierra de baja calidad cuyo valor de producción apenas cubre los costes de cultivo (European Environmental Agency).

Pero "tierra marginal" no viene únicamente definido por características biofísicas como baja fertilidad del suelo, tierras con elevadas pendientes, presencia de agua salina o condiciones climáticas extremas, sino también depende de otros factores como la especie vegetal que se va a cultivar, la proximidad a los mercados, la legislación y otros usos de la tierra (Existe tierra que se puede utilizar de forma rentable para otros fines distintos a la agricultura, sea fértil o no. Por ejemplo, tierra rica en minerales o cercana a áreas residenciales).

Unos de los aspectos más interesantes de las gramíneas perennes es su capacidad de ser cultivadas en las denominadas "tierras marginales", debido a sus bajos requerimientos tanto hídricos como de fertilizantes (Cosentino y col., 2014) así como a sus beneficios ambientales, como por ejemplo la mejor conservación del suelo (McLaughlin y Walsh, 1998). A su vez, se aseguraría la producción de biomasa sin invadir las tierras agrícolas (Cosentino y col., 2014). Pero para ello, dado que las tierras marginales no presentan las mejores condiciones para el cultivo por la presencia de distintos estreses (hídrico, salino, altas temperaturas o incluso inundaciones), es necesario la búsqueda de las especies (o ecotipos) más adecuadas a estas condiciones ambientales.

### **1.5.- Características y diferencias de las especies C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>**

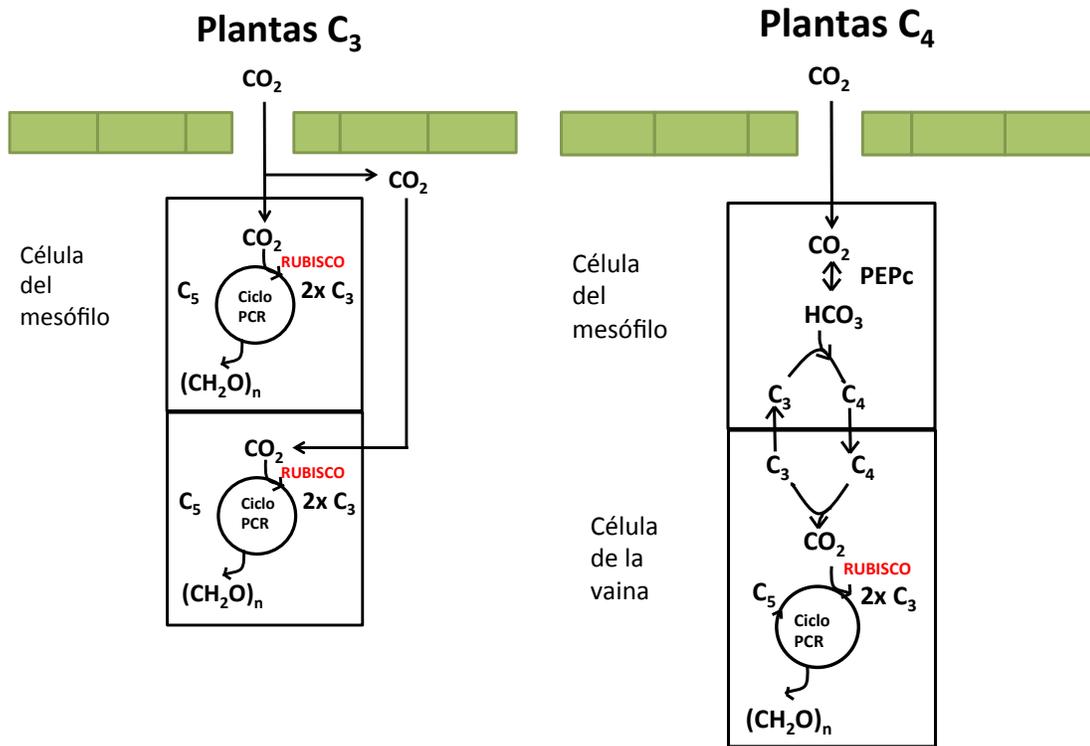
La fotosíntesis es uno de los procesos básicos de la vida de las plantas. Dentro de las especies vegetales se han encontrado distintas variantes al mecanismo molecular de fijación y asimilación del CO<sub>2</sub>, que están relacionados con los procesos de adaptación a entornos con condiciones ambientales adversas (Sage, 2004). En función del mecanismo de fijación del carbono las especies vegetales se clasifican en especies C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y CAM. Cabe mencionar que en esta Tesis trataremos solamente las especies C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>, y es por ello que solamente se explican estas dos rutas metabólicas.

El ciclo de Calvin (o ciclo fotosintético de reducción del carbono, PCR), que es común a todos los organismos fotosintéticos, consiste en una serie de reacciones bioquímicas con

la finalidad de asimilar el CO<sub>2</sub> atmosférico. Se denomina C<sub>3</sub> a aquellas especies (la mayoría de las presentes en la Tierra) cuyo primer producto de la fotosíntesis es una molécula de tres átomos de carbono y que en sus hojas hay un solo tipo de cloroplastos. La ribulosa-1,5-bisfosfato se carboxila mediante la enzima Rubisco produciendo fosfoglicerato (3-PGA; Fig. 1.5.1). El mayor problema de las especies C<sub>3</sub> es que la enzima Rubisco cataliza dos reacciones que compiten entre ellas: la carboxilación y la oxigenación (Portis y Parry, 2007). La reacción de oxigenación desvía el flujo de carbono hacia la vía fotorrespiratoria, disminuyendo el carbón fijado entre un 25 y un 30%.

Las plantas C<sub>4</sub> son una adaptación de las plantas C<sub>3</sub> para evitar la limitación de la fotorrespiración, aumentando la eficiencia fotosintética y minimizando las pérdidas de agua en ambientes calurosos y secos (Edwards y Walker, 1983). Para ello las plantas C<sub>4</sub> presentan dos formas celulares implicadas en la fotosíntesis: las células del mesófilo y las células de la vaina, que conforman la anatomía en corona o Kranz (Hatch, 1987; Sage, 2004). Las células del mesófilo se encuentran bajo la epidermis rodeando a las células de la vaina, que son más gruesas y se distribuyen formando un anillo alrededor de los haces vasculares. En las especies C<sub>4</sub>, previa a la carboxilación similar a las C<sub>3</sub>, se produce una primera carboxilación del ácido fosfoenolpirúvico (PEP), mediante una enzima diferente denominada fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPc), originando un producto estable de cuatro átomos de carbono, el ácido málico (tipo NADP-ME) o el ácido aspártico (Tipo NAD-ME y PEP-CK; Table 1.5.1).

La característica clave de la fotosíntesis en las especies C<sub>4</sub> (como *P. virgatum* L.) es el funcionamiento de un mecanismo de concentración de CO<sub>2</sub> en torno a la enzima Rubisco en la vaina del haz, que conduce a una disminución de la fotorrespiración así como una saturación de la fotosíntesis a una menor concentración de CO<sub>2</sub> que para especies C<sub>3</sub> (Sage, 2004; Ghannoum, 2009). A su vez, las especies C<sub>4</sub> presentan una mayor eficiencia en el uso del nitrógeno (NUE, "Nitrogen Use Efficiency") debido a un menor requerimiento de nitrógeno en la hoja como resultado de una mayor tasa de rotación catalítica de la Rubisco (Ghannoum y col., 2011).



**Fig. 1.5.1.-** Esquema simplificado de las rutas metabólicas de fijación del carbono de las especies  $C_3$  y  $C_4$ . Abreviaciones:  $C_3$ , ácidos orgánicos de tres átomos de carbono;  $C_4$ , ácidos orgánicos de cuatro átomos de carbono;  $C_5$ , ribulosa-1,5-bifosfato; PCR, Ciclo fotosintético de reducción del carbono; PEPc, fosfoenolpiruvato carboxilasa; Rubisco, ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa. Adaptado de Lara y Andreo (2011).

En condiciones ambientales favorables, las especies  $C_3$ , al tener los estomas abiertos, sufren una pérdida constante de agua a través de ellos. Por lo tanto se espera una mayor eficiencia fotosintética, nutricional y de uso de agua en una especie  $C_4$  cultivada en condiciones adecuadas que en una  $C_3$  (Beale y col., 1999). En condiciones de estrés, los estomas se cierran para evitar la pérdida de agua, disminuyendo la difusión del  $CO_2$  y, por tanto, aumentando la actividad fotorrespiratoria. Según Sage (2004), la mayor eficacia fotosintética de las especies  $C_4$  les confiere una ventaja en su adaptación a ambientes con altas temperaturas, poca agua y alta salinidad.

**Tabla 1.5.1.-** Diferencias morfológicas y fisiológicas de las especies C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>. Fuente: Leegood (1993).

	<b>C<sub>3</sub></b>	<b>C<sub>4</sub></b>
	<b>Trigo, cebada, patata, arroz, tomate</b>	<b>Maíz, caña de azúcar</b>
<b>% de la flora mundial en número de especies</b>	89%	<1%
<b>Hábitat típico</b>	Amplia distribución	Sitios cálidos y praderas
<b>Primer producto estable de la fijación de CO<sub>2</sub></b>	3-PGA	Malato o Aspartato
<b>Anatomía</b>	Vaina del haz vascular no presente o sin cloroplastos	Vaina del haz vascular con cloroplastos (Kranz)
<b>Fotorrespiración</b>	Hasta el 40% de la fotosíntesis	No detectable
<b>Eficiencia en el uso del agua (EUA) (g CO<sub>2</sub> fijado por Kg de H<sub>2</sub>O transpirada)</b>	1-3	2-5

Dentro de las especies C<sub>4</sub> se han descrito tres subtipos diferentes según el tipo de enzima que utilizan en la descarboxilación de las moléculas de cuatro átomos de carbono (Hatch, 1987; Pinto y col., 2014): 1) málico descarboxilasa dependiente de NADP (NADP-ME), 2) málico descarboxilasa dependiente de NAD (NAD-ME) y 3) fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEP-CK).

### **1.6.- Estreses ambientales**

El término “estrés” está ampliamente utilizado en fisiología vegetal, pero no existe una única definición del concepto. Levitt (1980) definió el estrés como “cualquier factor ambiental potencialmente desfavorable para los organismos vivos”. A su vez, considera que una planta está sometida a un estrés cuando se encuentra en unas condiciones bastante diferentes a las óptimas para su crecimiento. En este sentido, los requerimientos óptimos, y, por tanto, la susceptibilidad a un determinado estrés, son diferentes según las especies vegetales (Levitt, 1980).

Según Azcón-Bieto y Talón (2008) los estreses se pueden clasificar como:

- Estreses abióticos: Causan alteración en el metabolismo celular con efecto sobre la fisiología y el desarrollo de las plantas según factores:

- Físicos: déficit o exceso de agua, altas o bajas temperaturas, radiación UV.
- Químicos: salinidad, contaminación por metales pesados, etc.

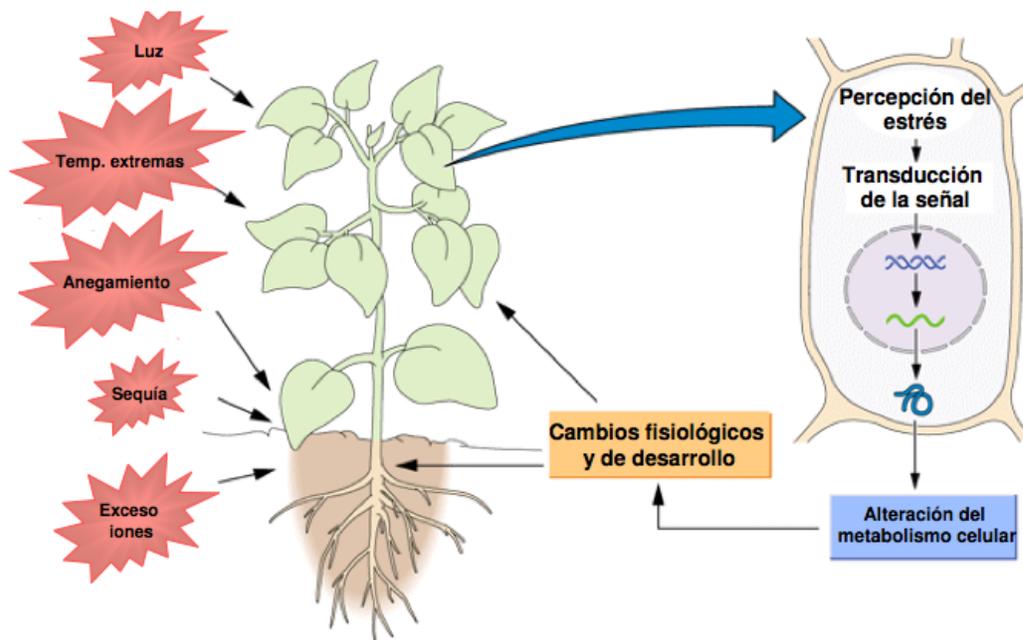
- Estreses bióticos: Son causados por la acción de otros seres vivos (animales, otras plantas, microorganismos y los virus), como la competencia entre especies, la herbivoría, la alelopatía y los patógenos.

La respuesta de las plantas al estrés puede dividirse en tres fases temporales (Lambers y col., 1998):

- Fase de alarma: es el efecto inmediato (de segundos a días) que el estrés produce en la planta, principalmente suele ser la ralentización de sus funciones fisiológicas básicas (el crecimiento). Al reaccionar la planta se activan los mecanismos frente al estrés. Si una planta no dispone de estos mecanismos de defensa o respuesta ante el estrés la planta sufre daños irreversibles y muere.
- Aclimatación: es el ajuste morfológico y fisiológico que realiza la planta en una escala temporal de días a semanas para compensar el peor funcionamiento tras la exposición al estrés. El metabolismo celular se acomoda a las nuevas condiciones, se activan los procesos de reparación de la maquinaria celular dañada y se expresan las adaptaciones morfológicas.
- Adaptación: es la respuesta evolutiva que resulta de cambios genéticos en las poblaciones. Ocurre en una escala temporal mucho mayor que la aclimatación, y tras muchas generaciones.

Cuando la planta se somete a condiciones ambientales adversas, ésta responde poniendo en marcha una serie de acciones complejas. En primer lugar, la planta percibe el estímulo estresante y procesa la señal de estrés percibida, amplificando e integrando la información en una o varias rutas de transmisión, produciéndose los cambios en la expresión génica necesarios para hacer frente al estrés, como se observa en la Fig. 1.6.1.

En esta Tesis trataremos tres estreses abióticos: el estrés hídrico, el salino y el estrés por bajas temperaturas y oscuridad continua. La sequía, junto con la salinidad, son dos factores ambientales muy importantes que limitan la producción de los cultivos en muchos lugares del mundo, pero sobre todo en regiones áridas y semiáridas, como es el área Mediterránea (Araus y col., 2002). El estrés por bajas temperaturas se divide en "chilling" (cuando la temperatura se sitúa entre 0 y 15°C) y en "freezing" (cuando la temperatura es inferior a 0°C; Tambussi, 2004). El estrés por baja temperatura se produce muchas veces junto a otros estreses, sobre todo estrés hídrico.



**Fig. 1.6.1.-** Esquema de las acciones llevadas a cabo por la planta en reacción a las condiciones ambientales adversas.

### 1.6.1.- Estrés hídrico

El estrés hídrico, denominado así al estrés por déficit de agua, interactúa muchas veces con otros estreses como las altas temperaturas y la alta irradiancia, tal y como suele ocurrir en la zona mediterránea (Nilsen y Orcutt, 1996), siendo el principal factor abiótico que limita la distribución geográfica y el rendimiento de la mayoría de los cultivos (Araus y col., 2002).

Según Turner (1988) el estado hídrico de la planta se caracteriza por su potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) y el contenido relativo de agua (RWC, "*Relative Water Content*"), que es el porcentaje de agua en relación al contenido de agua en condiciones de máxima hidratación. El estrés hídrico produce una disminución del contenido hídrico en las hojas y la pérdida de turgencia de las células, generando por tanto una disminución del RWC (Lawlor y Cornic, 2002). Esto trae consigo una reducción del crecimiento de la planta (Passioura y col., 1993), afectando también a los procesos fisiológicos y bioquímicos, como la fotosíntesis, la respiración, el metabolismo nutricional y el contenido de clorofilas (Massacci y col., 2008).

El principal limitante de la fotosíntesis bajo condiciones de estrés hídrico es la disminución de la conducción estomática ( $g_s$ ; Cornic, 2000), ya que genera una disminución de la concentración interna de  $CO_2$ , inhibiendo el metabolismo fotosintético.

Las respuestas de las plantas al estrés hídrico se clasifican de la siguiente manera:

- Escapar: Las plantas ajustan su fenología para cumplir su ciclo fuera de los periodos de déficit hídrico, tal y como ocurre en las plantas terófitas o anuales.
- Evitar: Las plantas poseen mecanismos para prevenir los efectos nocivos (Schulze y col., 2005), es decir, evitar (o postergar) la deshidratación (Blum, 2005). Existen especies vegetales denominadas "derrochadoras de agua" ("*water-spenders*") que disminuyen la resistencia hidráulica (Nilsen y Orcutt, 1996) y especies "ahorradoras de agua" ("*water-savers*") que minimizan las pérdidas de agua cerrando estomas y disminuyendo la transpiración. En estas últimas, por lo tanto, hay una reducción del tamaño de la planta y del área foliar, aumentando la proporción relativa de biomasa radicular (Blum, 2005).
- Tolerar: Las plantas presentan rasgos que le permiten soportar las condiciones adversas (Schulze y col., 2005). Por ejemplo, son capaces de resistir de forma reversible la deshidratación de los tejidos reduciendo la actividad química del agua, concentrando solutos y macromoléculas y produciendo modificaciones en

las membranas celulares. Según Blum (2005), la tolerancia a la deshidratación como mecanismo efectivo contra la sequía suele ocurrir en semillas, aunque una vez germinadas pierden su tolerancia.

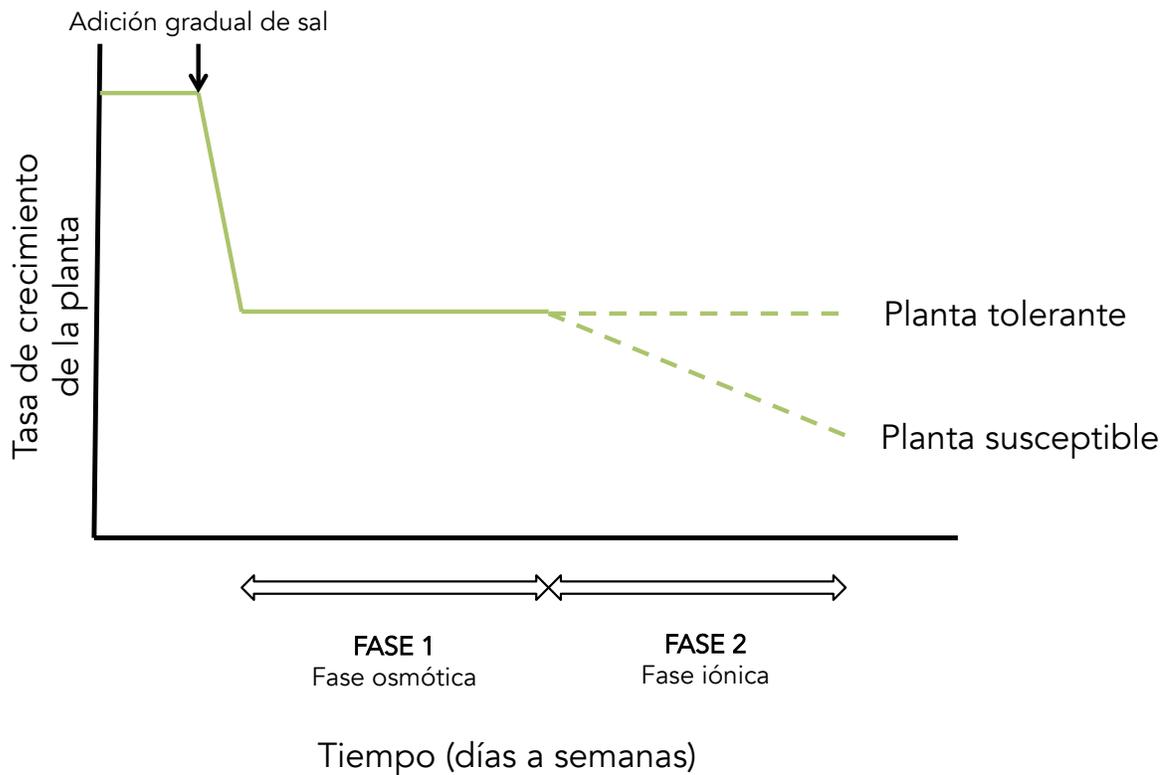
### **1.6.2.- Estrés salino**

La salinidad es considerada por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) la segunda mayor causa de pérdida de tierra, y se estima que 34 millones de hectáreas, aproximadamente el 11% de las áreas irrigadas, son afectadas por algún nivel de salinización (FAO, 2013). Según este informe, en algunos países con regiones semiáridas, el porcentaje de superficie de regadío afectada en mayor o menor grado por la salinidad es de entre un 10 y un 50%, produciendo una disminución del rendimiento de los cultivos entre un 10 y un 25%. Por lo tanto, la salinidad es uno de los retos más importantes que enfrenta el suministro de alimentos para la población mundial en un futuro (Wilhelm, 2014).

La respuesta de la planta al estrés salino se produce en dos fases (Fig. 1.6.2): 1) Fase osmótica: una respuesta prácticamente inmediata al aumento de la concentración de sal alrededor de las raíces, es decir, a la disminución del potencial hídrico del substrato y 2) Fase iónica: una respuesta más lenta debido a la toxicidad asociada a la acumulación de  $\text{Na}^+$  en las células de las hojas más antiguas de la planta (Munns, 2002; Munns y Tester, 2008).

La salinidad reduce la capacidad de las plantas para absorber el agua, produciendo por tanto una reducción de la tasa de crecimiento, causando a su vez cambios metabólicos similares a los generados por el estrés hídrico (Munns, 2002). En esta primera fase, se reduce la velocidad a la que crecen las hojas, las nuevas hojas emergen con mayor lentitud y las yemas laterales de las plantas se desarrollan más lentamente o permanecen en reposo (Munns y Tester, 2008). Curiosamente, Munns y Tester (2008) remarcan cómo el crecimiento de la parte vegetativa se ve más afectado por la salinidad que la parte subterránea, disminuyendo así el uso del agua por la planta, conservando la humedad del suelo y evitando un aumento de la concentración de sal en el suelo. En la segunda fase,

se produce la senescencia de las hojas al aumentar el nivel de sal en las hojas maduras hasta niveles tóxicos. Esto trae consigo una disminución de la cantidad de fotoasimilados que la planta puede producir, y por lo tanto, una reducción de los asimilados transportados a los tejidos en crecimiento, limitando en mayor medida el crecimiento de la planta (Munns, 2002; Munns y Tester, 2008). Según Munns (2002), tal y como sea la respuesta de las plantas a esta segunda fase es que se les clasificará de tolerantes o susceptible a la salinidad (Fig. 1.6.2).



**Fig. 1.6.2.-** Esquema de las dos fases de respuesta a la salinidad de las plantas. Imagen adaptada de Munns (2005).

Los mecanismos de tolerancia a la salinidad se pueden clasificar en tres categorías (Munns y Tester, 2008):

- Tolerancia al estrés osmótico: En especies vegetales dedicadas a la agricultura, se considera que una planta es tolerante al estrés osmótico cuando es capaz de mantener su crecimiento, es decir, continúa teniendo crecimiento de las hojas y

una elevada conductancia estomática. Por el contrario, en un contexto ecológico (especialmente para especies perennes) una planta se considera tolerante al estrés osmótico cuando es capaz de sobrevivir a éste.

- Exclusión del  $\text{Na}^+$ : Se produce en especies vegetales capaces de excluir  $\text{Na}^+$  por las raíces, evitando así una acumulación tóxica de iones en las hojas. Cuando el estrés salino ocurre durante días o semanas suele producirse fallos en la exclusión de  $\text{Na}^+$ , acumulándose en las hojas y causando la muerte prematura de las más viejas.
- Tejidos tolerantes a la acumulación de  $\text{Na}^+$ : Se produce una compartimentación de los iones ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ) a nivel celular e intracelular para evitar concentraciones tóxicas en el citoplasma, sobre todo en las células del mesófilo en la hoja. La toxicidad se produce con el tiempo, cuando la concentración de  $\text{Na}^+$  aumenta hasta altas concentraciones en las hojas más antiguas.

### **1.6.3.- Estrés por baja temperatura y oscuridad**

La temperatura es otro factor importante que limita la fotosíntesis tanto en especies  $\text{C}_3$  como en especies  $\text{C}_4$  (Bernacchi y col., 2002). Los efectos de las bajas temperaturas incluyen cambios en la bioquímica y la biofísica de las membranas, en la síntesis proteica, modificaciones conformacionales en enzimas, en la ultraestructura de mitocondrias y cloroplastos (Kratsch y Wise, 2000), en los metabolismos fotosintético y respiratorio (Nilsen y Orcutt, 1996) y una disminución del desarrollo (Allen y Ort, 2001).

En primer lugar, el frío promueve el cierre estomático, que puede provenir de la existencia de déficit hídrico, por un aumento de la concentración intracelular de  $\text{CO}_2$  ( $c_i$ ) debido a la disminución de la tasa de asimilación y por efecto directo de las bajas temperaturas en los estomas (Allen y Ort, 2001).

El frío produce una "separación de fases" en las membranas, que si se prolonga en el tiempo, impide mantener los gradientes iónicos y el metabolismo comienza a sufrir alteraciones, llegando a alcanzar la muerte de la célula si el daño se acentúa. Nilsen y

Orcutt (1996) señalan que los cloroplastos parecen ser los órganos más sensibles a las bajas temperaturas. Cuando el estrés por baja temperatura se produce en presencia de luz ("*light-chilling*") puede afectar a todos los componentes del aparato fotosintético, como por ejemplo el transporte electrónico tilacoidal (Allen y Ort, 2001), causando un daño permanente al FOTOSISTEMA II (PSII; Osmond y Grace, 1995).

Como ocurre con el resto de estreses, el daño producido por las bajas temperaturas varía según las especies, tanto en magnitud como en la escala temporal en la que aparecen los primeros síntomas.

La luz es otro de los factores importantes en la fotosíntesis, ya que regula la compleja actividad de las enzimas fotosintéticas en el ciclo de Calvin y en el transporte de electrones. Por lo tanto, la falta de luz causa una parada en la captación del CO<sub>2</sub> atmosférico, parando por tanto el ciclo de Calvin porque muchas enzimas, como la Rubisco o la PEPc son activadas mediante la luz roja vía fitocromo.

### **1.7.- Los isótopos estables en ecofisiología**

Los isótopos son átomos del mismo elemento que tienen el mismo número de protones, diferenciando únicamente en el número de neutrones. Los distintos isótopos de un átomo pueden ser estables (que se mantienen una vez formados) o inestables (o radiactivos, que se desintegran espontáneamente hasta que se convierten en isótopos estables; Dawson y Brooks, 2001).

Los elementos más abundantes en la biosfera son el carbono (C), el hidrógeno (H), el oxígeno (O) y el nitrógeno (N). Los isótopos estables de prácticamente todos los elementos están formados por un isótopo muy abundante y uno o dos de muy baja abundancia. La abundancia relativa es el porcentaje de cada isótopo en relación al número total de átomos del elemento (Tabla 1.7.1).

**Tabla 1.7.1.-** Isótopos estables y abundancia relativa (adaptado de Mateo y col., 2003)

<b>Elemento</b>	<b>Isótopo estable</b>	<b>Abundancia relativa (%)</b>
Hidrógeno	<sup>1</sup> H	99,985
	<sup>2</sup> H	0,015
Carbono	<sup>12</sup> C	98,892
	<sup>13</sup> C	1,108
Nitrógeno	<sup>14</sup> N	99,635
	<sup>15</sup> N	0,365
Oxígeno	<sup>17</sup> O	0,037
	<sup>18</sup> O	0,204

La composición isotópica ( $\delta$ ) es otra manera de expresar la abundancia isotópica e indica la proporción de los isótopos estables en un material respecto a un compuesto estándar (Boutton, 1991). Se determina por espectrometría de masas según la siguiente ecuación:

$$\delta (\text{‰}) = (R_{\text{muestra}}/R_{\text{estándar}} - 1) \times 1000$$

donde  $R_{\text{muestra}}$  y  $R_{\text{estándar}}$  son las relaciones molares de los isótopos pesados y ligeros (ej. <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) en la muestra y en el patrón internacional, respectivamente. Dado que las diferencias en las relaciones entre la muestra y el estándar son muy pequeñas, los valores se expresan en tanto por mil (‰).

Por convenio, las abundancias (o sus variaciones) se expresan en relación al isótopo minoritario, por lo que cualquier acontecimiento que aumente la proporción de <sup>13</sup>C respecto a <sup>12</sup>C se define como enriquecimiento, mientras que si la alteración disminuye la proporción de <sup>13</sup>C se define como empobrecimiento. Por lo tanto, valores positivos de  $\delta^{13}\text{C}$  significa que la muestra está enriquecida en <sup>13</sup>C respecto del estándar (contiene más <sup>13</sup>C que el estándar), mientras que valores negativos de  $\delta^{13}\text{C}$  indican un empobrecimiento de la muestra en <sup>13</sup>C.

En el caso de esta Tesis, los isótopos a utilizar serán el carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y el nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ), para los cuales se utiliza como referente estándar *Pee Dee Belemnite* (PDB) y el N<sub>2</sub> del aire, respectivamente.

En los isótopos estables, al diferir en el número de neutrones (y por tanto en la masa atómica), las propiedades químicas son similares mientras que las físicas son diferentes.

Esta alteración de las propiedades físicas provoca que los distintos isótopos tengan un comportamiento químico y físico desigual. Por lo tanto, uno de los isótopos tiene preferencia por cada una de las reacciones físicas y químicas, haciendo que la composición del producto de la reacción sea distinta respecto al reactivo. A este fenómeno se le denomina "fraccionamiento isotópico" (o "discriminación isotópica"; Dawson y Brooks, 2001), y suele actuar en contra del isótopo más pesado.

La fotosíntesis presenta diversos puntos de fraccionamiento, de los cuales los más importantes son la difusión y la carboxilación (Farquhar y col., 1982). Durante la asimilación del CO<sub>2</sub> en plantas C<sub>3</sub> se produce una discriminación en contra del isótopo más pesado (<sup>13</sup>C) tanto a nivel de la difusión del CO<sub>2</sub> a través de los estomas (4,4‰; Craig, 1954) como a nivel de la carboxilación por parte de la Rubisco (29‰; Farquhar y col., 1989b). Por tanto, la materia orgánica de las especies C<sub>3</sub> está empobrecida en <sup>13</sup>C (es decir, tiene más abundancia de <sup>12</sup>C que el aire). La composición isotópica del carbono de la materia orgánica total (TOM, "*Total Organic Matter*" en inglés; δ<sup>13</sup>C<sub>TOM</sub>) en plantas C<sub>3</sub> se sitúa entre -24 y -30‰ (Ghashghaie y col., 2003), que es un valor mucho más negativo que el del aire (≈ -9‰). En el caso de las especies C<sub>4</sub>, el primer paso de la fotosíntesis es similar al de las especies C<sub>3</sub>: la difusión del CO<sub>2</sub> de la atmósfera al interior a través de los estomas. Sin embargo, la vía C<sub>4</sub> está catalizada por la PEPc, que tiene diferente discriminación en la fijación del CO<sub>2</sub> (6‰; Farquhar, 1983). Los compuestos de cuatro átomos de C producidos por la PEPc son transportados dentro de la vaina del haz, donde son metabolizados en compuestos de tres átomos de carbono, liberando CO<sub>2</sub>, que se acumula en grandes concentraciones. Este CO<sub>2</sub> libre es fijado de nuevo por la enzima Rubisco, tal y como lo hace una especie C<sub>3</sub>. Sin embargo, los valores de δ<sup>13</sup>C no son iguales entre especies con distinta ruta metabólica. Según Berry (1989), los valores de <sup>13</sup>C<sub>TOM</sub> de las especies C<sub>4</sub> (entre -9 y -20‰; Badeck y col., 2005) son causados no solamente por la diferencia en la discriminación de las enzimas, sino también porque el bicarbonato fijado en el mesófilo por la enzima PEPc (y así formar la molécula de 4 átomos de C) se encuentra enriquecido en <sup>13</sup>C en comparación con el CO<sub>2</sub> (Hobbie y Werner, 2004).

Farquhar y Richards (1984) observaron cómo la discriminación isotópica del carbono ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) mantiene una relación inversa con la eficiencia en el uso del agua, y se calcula a partir del factor de fraccionamiento  $\alpha$  (la relación entre el producto dividido por la fuente):

$$\alpha = R_p/R_r$$

$$\Delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \alpha - 1 = (\delta_r - \delta_p) / (1 + \delta_p/1000)$$

donde  $\delta_r$  y  $\delta_p$  son la composición isotópica de los reactivos y productos, respectivamente. Según este modelo, la reducción de la conductancia estomática produciría una disminución de la disponibilidad de  $\text{CO}_2$  para la Rubisco, y por lo tanto un descenso en la discriminación. Es decir, cuando la disponibilidad de  $\text{CO}_2$  es mayor, la Rubisco tiene mayor posibilidad de elegir qué isótopo de carbono asimilar, por lo que se produce una mayor discriminación a favor del isótopo  $^{12}\text{C}$ , que es el más ligero. A medida que el  $^{12}\text{CO}_2$  se va consumiendo, el  $\text{CO}_2$  restante queda enriquecido de  $^{13}\text{C}$ , de manera que la Rubisco pierde la capacidad de discriminación y se ve obligada a asimilar más  $^{13}\text{C}$  (O'Leary, 1981). La eficiencia en el uso del agua (WUE, "*Water Use Efficiency*" en inglés) se puede medir indirectamente a través de la variación de la  $\delta^{13}\text{C}$  en un tejido vegetal, debido a su relación con los procesos de intercambio de agua y  $\text{CO}_2$  a través de los estomas (Farquhar y col., 1982; Farquhar y col., 1989). Durante el proceso de fotosíntesis la planta tiende a un balance entre el nivel de pérdida de agua por transpiración y la fijación del carbono, creando una determinada proporción de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  (Zhang y col., 1997).

En condiciones de estrés, principalmente hídrico y salino, la planta reduce la pérdida de agua por transpiración cerrando los estomas (Lawlor y Cornic, 2002; Flexas y Medrano, 2002), reduciendo el flujo de  $\text{CO}_2$  en el espacio interior de las plantas y, por tanto, limitando la actividad fotosintética y la fijación del carbono (Flexas y col., 2004). Es decir, el efecto del estrés sobre las plantas genera una disminución de la discriminación del carbono  $\Delta^{13}\text{C}$  (o un aumento en la composición isotópica del carbono,  $\delta^{13}\text{C}$ ) en la materia orgánica de la planta (Farquhar y col., 1989b).

La discriminación isotópica se ha descrito, además de en la fotosíntesis, en la respiración en oscuridad (Ghashghaie y col., 2003; Tcherkez y col., 2003; Nogués y col., 2004). Éstos

autores han observado una discriminación positiva en la respiración de entre el 3 y el 6%, es decir, la composición isotópica del carbono respirado ( $\delta^{13}C_R$ ) está enriquecida en  $^{13}C$  en relación a la composición de la hoja. Una de las causas de esta discriminación a favor del isótopo más pesado ( $^{13}C$ ), que como hemos comentado no es habitual, es la presencia del  $^{13}C$  en las posiciones 3 y 4 de las hexosas, que es el lugar preferente de rotura de la molécula por parte de la piruvato deshidrogenasa (PDH), que es una enzima implicada en la respiración (Tcherkez y col., 2003).

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para la vida, y el crecimiento y desarrollo de las plantas depende de su suministro y asimilación por parte de éstas. El N puede ser absorbido como nitrato ( $NO_3^-$ ; la gran mayoría) o como amonio ( $NH_4^+$ ). Una vez que el nitrógeno es absorbido por las raíces, el primero paso de la asimilación del nitrato es su reducción a nitrito ( $NO_2^-$ ) por la enzima nitrato reductasa (NR). La mayoría de este nitrato es reducido en la hoja, pero también hay una pequeña fracción que se reduce en las raíces (Tcherkez y Hodges, 2008). Posteriormente, el nitrito ( $NO_2^-$ ) es reducido a amonio ( $NH_4^+$ ) por la nitrito reductasa (NiR), que es incorporado posteriormente a los aminoácidos.

El uso de isótopos estables ( $^{14}N/^{15}N$ ) ha traído consigo una importante contribución para entender la asimilación del nitrógeno y su interacción con el carbono (Tcherkez y Hodges, 2008). Al igual que hemos comentado para el carbono, las enzimas de la planta también discriminan entre el isótopo más pesado ( $^{15}N$ ) y el isótopo más ligero ( $^{14}N$ ), como consecuencia de la reacción más rápida del isótopo ligero. Si la disponibilidad de nitrato es elevada y la resistencia asociada a la absorción de nitrato es baja, el proceso de reducción del nitrato consume pocas de las moléculas de nitrato disponibles, produciéndose discriminación  $^{14}N/^{15}N$  en el proceso. Si por el contrario la disponibilidad de nitrato es baja no se produce discriminación  $^{14}N/^{15}N$  durante la reducción del nitrógeno (Tcherkez y Hodges, 2008).

Es decir, el fraccionamiento isotópico del Nitrógeno en la planta depende de:

- la asimilación de nitrato ( $NO_3^-$ ) o de amonio ( $NH_4^+$ )
- la translocación hacia las hojas

- el metabolismo del nitrógeno en el citoplasma.

Según Tcherkez y Hodges (2008), la incorporación de nitrato tiene un efecto isotópico de entre 0,3‰ y 3‰. A su vez, estos autores sostienen que el fraccionamiento isotópico del nitrógeno disminuye con la edad de la planta y la intensidad lumínica.

La composición isotópica del  $^{15}\text{N}$  se calcula según:

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

donde  $\delta^{15}\text{N}_a$  y  $\delta^{15}\text{N}_e$  son la composición isotópica del nitrógeno asimilado y del nitrato externo del suelo respectivamente;  $n_i$  y  $n_e$  son la concentración interna de nitrógeno y externa de nitrato en el suelo;  $\Delta_r$  es el fraccionamiento asociado a la asimilación (la reducción del nitrógeno) y  $\Delta_u$  es el fraccionamiento asociado a la absorción. De acuerdo con Tcherkez y Hodges (2008) la composición isotópica en los tejidos varía entre -10‰ y 10‰.

## **OBJETIVOS**



El objetivo general de esta Tesis ha sido caracterizar las respuestas ecofisiológicas en dos especies de interés para la producción de biomasa frente a varias condiciones de estrés ambiental, considerando que éstas se volverán más severas debido a la actividad humana y al cambio climático.

Los objetivos concretos de la Tesis han sido:

- Realizar una caracterización fisiológica de dos especies de gramíneas perennes (*A. donax* L. y *P. virgatum* L.) frente a condiciones adecuadas de crecimiento.
- Estudiar el efecto del estrés hídrico, el estrés salino y el estrés por baja temperatura en la fisiología y producción de biomasa de dos especies de gramíneas perennes (*A. donax* L. y *P. virgatum* L.).
- Clasificar ocho clones de *Arundo donax* L.: "Piccoplant", "Fondachello", "Martinensis", "Granadensis", "Tortorici", "Cefalú", "Agrigento" y "Licata", de acuerdo a su resistencia a estrés hídrico, salino y la combinación de ambos.
- Estudiar la variación en el  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  en ambas especies de gramíneas perennes modulado por el estrés hídrico.



## **MATERIALS AND METHODS**



### 3.1.- Plant material

This Thesis is based on the physiological responses to different stresses of two species of perennial grasses, *Arundo donax* L. (C<sub>3</sub>) y *Panicum virgatum* L. (C<sub>4</sub>). A summary about the experiments (experimental conditions, plant material, treatments and analysis) is described in Table 3.1.1.

**Table 3.1.1.-** Summary about the experimental design: experimental conditions, plant material, treatments and analysis.

EXPERIMENT	EXPERIMENTAL CONDITIONS	PLANT MATERIAL	TREATMENTS	ANALYSIS
I	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Greenhouse (UB; Ia) and outdoor environmental conditions (UNICT; Ib)</li> <li>- Stress applied in a vegetative stage</li> <li>- Long-term stress (2 months)</li> </ul>	8 clones of <i>A. donax</i> L. : "Piccoplant", "Fondachello", "Granadensis", "Martinensis", "Agrigento", "Tortorici", "Licata" y "Cefalú".	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Water stress (WS)</li> <li>- Salinity (S+)</li> <li>- Both stresses (WS S+)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gas exchange</li> <li>- Relative water content</li> <li>- Chlorophyll content</li> <li>- Biomass parameters</li> </ul>
II	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Greenhouse (UB)</li> <li>- Stress applied in a vegetative stage</li> <li>- Long-term stress (2 months)</li> </ul>	1 clone of <i>A. donax</i> L. ("Martinensis") and 1 clone of <i>P. Virgatum</i> L. ("Alamo")	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Water stress (WS)</li> <li>- Salinity (S+)</li> <li>- Both stresses (WS S+)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gas exchange</li> <li>- Relative water content</li> <li>- Chlorophyll content</li> <li>- Biomass parameters</li> </ul>
III	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Greenhouse and growth chamber (UB)</li> <li>- Stress applied in a vegetative stage</li> <li>- Short-term stress (21 days)</li> </ul>	1 clone of <i>A. donax</i> L. ("Piccoplant") and 1 clone of <i>P. Virgatum</i> L. ("Alamo")	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Water stress (WS)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gas exchange</li> <li>- Relative water content</li> <li>- Chlorophyll content</li> <li>- Biomass parameters</li> <li>- Stable isotopes <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N</li> </ul>

Experiments Ia, II and III were carried out at the premises of the Experimental Fields Service of the Faculty of Biology at University of Barcelona (Spain). Experiment Ib was conducted at the Experimental Fields at University of Catania (Italy).

*A. donax* L. clones used in Experiments Ia and Ib are shown in Table 3.1.2. Five of the clones used in Experiments Ia and Ib (namely 'Fondachello', 'Tortorici', 'Cefalú', 'Agrigento' and 'Licata') were collected from the Experimental Fields at University of Catania (Italy; hereinafter referred as UNICT; 10 m a.s.l., 37°24'N, 15°03'E), and whose

sites of origin are reported in Cosentino et al. (2006). Two clones (namely 'Martinensis' and 'Granadensis') used in Experiment I were collected in different riparian areas of Spain and a commercial clone ('Piccoplant') used in Experiment I was provided by a private company (Piccoplant, Oldenburg, Germany).

**Table 3.1.2.-** Name, place of collection and additional information about the clones of *A. donax* L. used in experiments Ia y Ib, II and III (m a.s.l is the abbreviation of meter above sea level).

Ecotype	Place of collection	Additional information	Experiment
Piccoplant	Oldenburg (Germany)	Commercial ecotype	Ia, III
Martinensis	San Martí Sarroca (Catalonia, Spain)	291 m a.s.l	Ia, II
Granadensis	Granada (Andalusia, Spain)	773 m a.s.l	Ia
Fondachello	East Sicily (Italy)	1 m a.s.l	Ia, Ib
Tortorici	North of Sicily (Italy)	450 m a.s.l	Ia, Ib
Cefalú	North of Sicily (Italy)	16 m a.s.l	Ia, Ib
Agrigento	South of Sicily (Italy)	230 m a.s.l	Ia, Ib
Licata	South of Sicily (Italy)	8 m a.s.l	Ia, Ib

In order to reduce heterogeneity at the beginning, careful multiplication of rhizomes were done to a similar fresh weight (i.e. the initial fresh weight ranged from 18.3 ±1.4 g in Piccoplant to 54.6 ±6.5 g in Agrigento in Experiment Ia and from 25.4 ±3.6 g in Tortorici to 52.8 ±2.2 g in Licata in Experiment Ib). The initial weight difference was imposed by the dimension and position of the single visible bud per rhizome.

*A. donax* L. plants for experiment II were collected in San Martí Sarroca (291mamsl, 41°23'14" N 1°36'43" E, Catalonia, Spain), named "Martinensis" and obtained from multiplication of rhizomes on January 2013, with an initial rhizome fresh weight of 33.2±4.4 g. On the other hand, *A. donax* L. plants for experiment III were obtained from a private company (Piccoplant, Oldenburg, Germany).

Seeds of *P. virgatum* L. cv. Alamo, which is a lowland subtype, for experiment II and III were germinated on moist filter paper in Petri dishes, placed in a long day chamber (16h of photoperiod) at a temperature of 22/18 °C day/night respectively and 70% HR.

### 3.2.- Experimental design

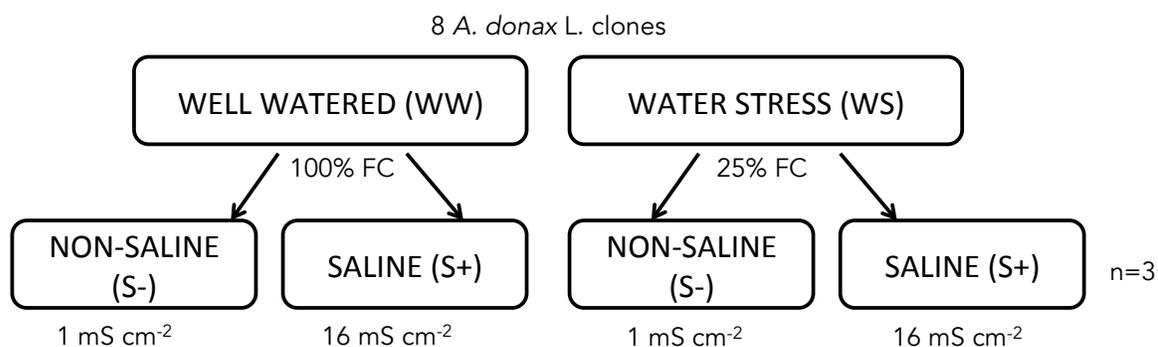
#### 3.2.1.- Experiment I: "Salinity and water stress effects on biomass production in different *Arundo donax* L. clones"

##### 3.2.1.1.- Experiment Ia: Screening for salinity and water stress (UB)

Plants were obtained from multiplication of rhizomes during January 2013. Plantlets were grown in a greenhouse in 5 L plastic pots containing peat:perlite:vermiculite (3:1:1) and irrigated with a complete Hoagland solution (Hoagland and Arnon, 1950). The average temperature and vapor pressure deficit (VPD) during the growth period were 25/15°C day/night and 0.75 kPa, respectively. Relative humidity ranged from 40 to 65% and the maximum PPFD was  $\sim 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The experiment was carried out from April to June 2013.

#### EXPERIMENT I: "SALINITY AND WATER STRESS EFFECTS ON BIOMASS PRODUCTION IN DIFFERENT *ARUNDO DONAX* L. CLONES"

##### Ia) Screening for salinity and water stress (UB)



**Fig. 3.2.1.-** Scheme of the experimental design of experiment Ia.

Four months after planting, plants were separated into four treatments (Fig. 3.2.1). Half of the plants were well watered at 100% field capacity (FC) and half of the plants (randomly selected) were exposed to water stress (WS) conditions (with water withholding) maintaining field capacity at 25%. Then, the well-watered and water stress plants were equally divided between saline (S;  $16 \text{ mS cm}^{-1}$  Hoagland solution) and non-saline

conditions (1 mS cm<sup>-1</sup> Hoagland solution). Saline solution was prepared by adding NaCl (PANREAC, 99% sodium chloride) to a complete Hoagland solution until it reached the appropriate saline concentration, as checked by a conductivity meter (Hanna Instruments, Romania).

Consequently, a total of three plants per clone were subjected to the following treatments: (i) well-watered with non-saline solution (WW S-), (ii) water stress with non-saline solution (WS S-), (iii) well-watered with saline solution (WW S+) and (iv) water stress with saline solution (WS S+). At the beginning of the experiment (T0) plants had two stems, a plant height from 30 to 60 cm and between 6 to 8 fully collared leaves.

Plants were subjected to these treatments for two months and parameters were measured every fifteen days (T15, T30, T45) in each plant until the end of the experiment (i.e. T60).

### **3.2.1.2.- Experiment Ib: Screening for increasing salinity levels (UB and UNICT)**

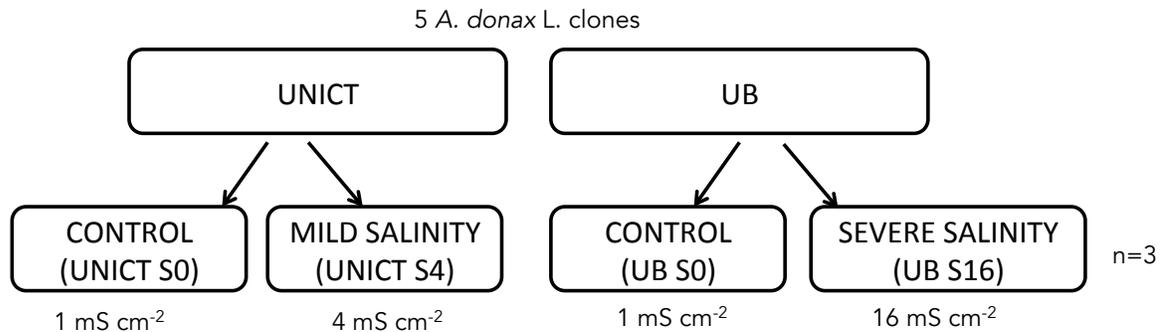
The screening of mild salinity stress was performed at UNICT (Italy) from May to December 2012 in pots with a diameter of 24 cm and with a capacity of 9.5 L, arranged in a randomised block experimental design with three replications. The pots arranged in an open space without any control of temperature, humidity, VPD or other environmental variables. During the experimental period, monthly maximum and minimum temperatures increased from May (25.9 and 10.7°C, respectively) to June (32.2 and 14.7°C) and peaked in July and August (35.7 and 19.1°C, in the average) to decrease in September (31.9 and 17.2°C), October (27.1 and 14.7°C), November (22.3 and 10.8°C) and the first ten days of December (15.1 and 5.1°C), when the harvest was carried out.

The substrate used was sphagnum peat with the following characteristics: 34% C<sub>org</sub>, N<sub>org</sub> 0.2%, dry substance 68%, pH 5.0 to 6.5. Two treatments were studied (Fig. 3.2.2): (i) Control (UNICT S0) where plants were watered with tap water (no NaCl added) and (ii) mild salinity stress (UNICT S4) where plants were watered with a saline solution of 4 mS cm<sup>-1</sup>. At each irrigation period NaCl was added to 17 L tap water for a total amount of 21±1.5 g of NaCl for S4 treatment and the values were checked by means of a Eutech

Cond 6+ conductivity meter (Thermo Fisher Scientific Inc.). All pots were maintained in well-watered condition with irrigation supplied up to FC twice a week.

### EXPERIMENT I: "SALINITY AND WATER STRESS EFFECTS ON BIOMASS PRODUCTION IN DIFFERENT *ARUNDO DONAX* L. CLONES"

#### lb) Screening for increasing salinity levels (UB and UNICT)



**Fig. 3.2.2.-** Scheme of the experimental design of experiment lb).

The screening of severe salinity stress was performed at the greenhouse of the Experimental Fields of the University of Barcelona (Spain; hereinafter referred as UB) from April to June 2013. Temperature was controlled daily at the greenhouse (25/18°C day/night). Two treatments were studied (Fig. 3.2.2): (i) Control (UB S0) where plants were watered with 1 mS cm<sup>-1</sup> Hoagland solution (no salt added) and (ii) severe salinity stress (UB S16) where plants were watered with a saline solution of 16 mS cm<sup>-1</sup>. Growing conditions are the same as reported above for experiment Ia.

#### **3.2.2.- Experiment II: "The response of *Arundo donax* L. (C<sub>3</sub>) and *Panicum virgatum* L. (C<sub>4</sub>) to different stresses"**

*A. donax* L. and *P. virgatum* L. were grown in plastic pots containing 5 L of peat: perlite: vermiculite (3:1:1) and were irrigated with a complete Hoagland solution (Hoagland and Arnon, 1950). The average temperature and vapour pressure deficit (VPD) during growth was 25/15°C day/night and 0.75 kPa, respectively. Relative humidity ranged from 40 to 65% and the maximum PPFD was ~1000 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

In order to study the response of these two species to different stresses, plants were subjected to two different experiments:

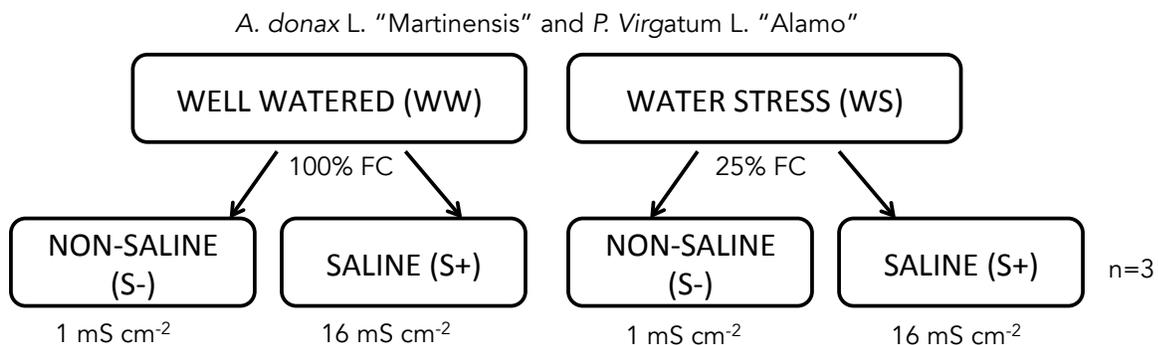
### 3.2.2.1.- Experiment IIa: Water stress and salinity

Three months after planting, plants were separated into four treatments (Fig. 3.2.3). Half the plants were subjected to water stress by withholding water until 25% of field capacity (FC). Then, well-watered (maintained at FC) and water stress plants were equally divided between salinity (e.g. 16 mS·cm<sup>-1</sup> Hoagland solution) and non-salinity (e.g. 1 mS cm<sup>-1</sup> Hoagland solution). Saline solution was prepared by adding NaCl (PANREAC, 99% Sodium Chloride) to a complete Hoagland solution until the appropriate saline concentration was reached. Consequently, a total of three plants per ecotype were subjected to the following treatments: (i) well-watered with non-saline solution (WW S-), (ii) water stress with non-saline solution (WS S-), (iii) well-watered with saline solution (WW S+) and, iv) water stress with saline solution (WS S+).

Plants were subjected to these treatments for two months and the plants were measured every fifteen days (i.e. T15, T30, T45) until the end of the experiment (i.e. T60).

## EXPERIMENT II: "THE RESPONSE OF *ARUNDO DONAX* L. (C<sub>3</sub>) AND *PANICUM VIRGATUM* L. (C<sub>4</sub>) TO DIFFERENT STRESSES"

### IIa) Water stress and salinity stress



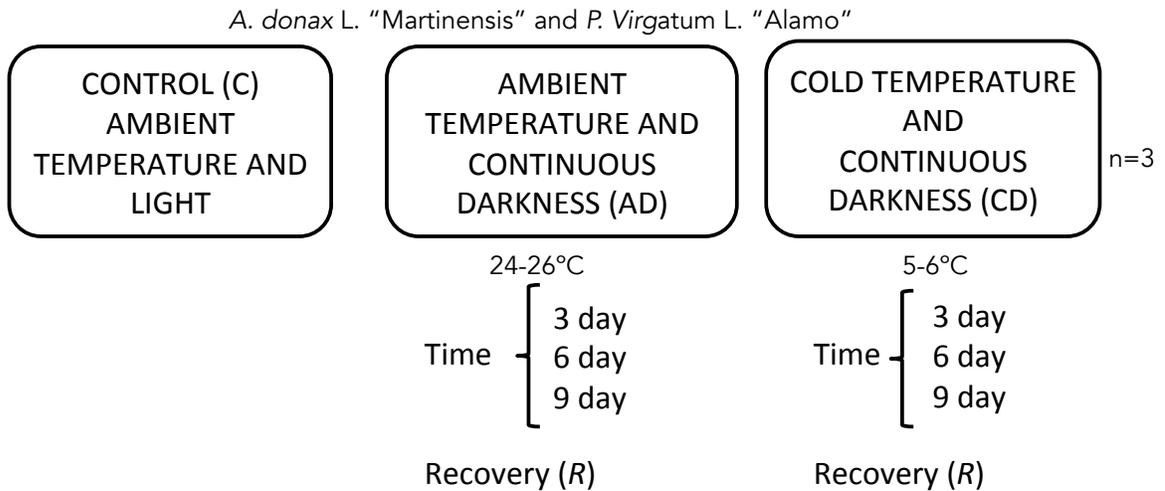
**Fig. 3.2.3.-** Scheme of the experimental design of experiment IIa.

**3.2.2.2.- Experiment IIb: Temperature and continuous dark stress**

Adult plants of *A. donax* L. "Martinensis" and *P. virgatum* L. "Alamo", which were grown in the same conditions as described in experiment IIa, were chosen and divided into three treatments (Fig. 3.2.4): (i) control, (ii) ambient temperature (24-26 °C) and continuous darkness (AD), and (iii) cold temperature (5-6 °C) and continuous darkness (CD). Each treatment was subdivided into three experimental conditions, which corresponded to 3, 6 and 9 days after the start of the treatment. After each experimental condition, the plants were returned to the greenhouse at the Experimental Field Service of Barcelona University (Barcelona, Spain) for approximately 24 h to study how they recovered from the stress treatment (R).

**EXPERIMENT II: "THE RESPONSE OF ARUNDO DONAX L. (C<sub>3</sub>) AND PANICUM VIRGATUM L. (C<sub>4</sub>) TO DIFFERENT STRESSES"**

**IIb) Temperature and continuous dark stress**



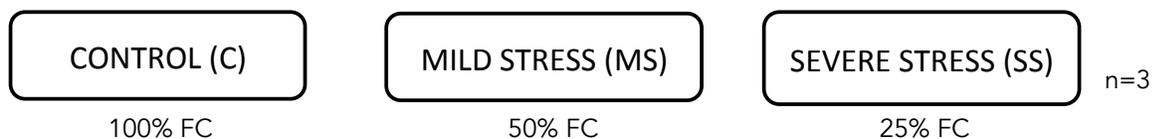
**Fig. 3.2.4.-** Scheme of the experimental design of experiment IIb.

**3.2.3.- Experiment III: “<sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N isotope labelling to study the response of two perennial grasses (*Arundo donax* L. and *Panicum virgatum* L.) to water stress”**

*A. donax* L. “Piccoplant” and *P. virgatum* L. “Alamo” were grown during six months in a greenhouse at the Experimental Field Service of Barcelona University (Barcelona, Spain) in plastic pots of 5 L of peat: perlite: vermiculite (3:1:1) and were irrigated with a complete Hoagland solution (Hoagland and Arnon, 1950). The average temperature and vapor pressure deficit (VPD) during the growth was 25/15°C day/night and 0.75 kPa, respectively. Relative humidity ranged from 40 to 65% and the maximum photosynthetic photon flux density (PPFD) was ~1000  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .  $\delta^{13}\text{C}$  of CO<sub>2</sub> in the greenhouse air ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{greenhouse}}$ ) was  $-11.8\text{‰} \pm 0.1\text{‰}$ .

**EXPERIMENT III: “<sup>13</sup>C AND <sup>15</sup>N LABELLING TO STUDY THE RESPONSE OF TWO PERENNIAL GRASSES (*ARUNDO DONAX* L. AND *PANICUM VIRGATUM* L.) TO DIFFERENT WATER STRESS”**

*A. donax* L. “Piccoplant” and *P. Virgatum* L. “Alamo”



**Fig. 3.2.5.-** Scheme of the experimental design of experiment III.

In order to study the response of these two species to different water stress levels (Fig. 3.2.5), six months after planting, plants were subjected to three water treatments during a 21 days: (i) Control (C, 100% Field Capacity), (ii) Mild Stress (MS, 50% FC) and (iii) Severe Stress (SS, 25% FC).

### 3.3.- Methods

#### 3.3.1.- Physiological measurements (Exp. I, II and III)

##### 3.3.1.1.- Gas exchange (Exp. I, II and III) and fluorescence parameters (Exp. II and III)

Leaf-level gas exchange was measured using a portable photosynthesis system (Li6400, Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA) provided with a Leaf Chamber Fluorometer (6400-40) of 2cm<sup>2</sup> and a 10% blue light source. Measurements were carried out at 25°C with a light saturated rate of 1200  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  of PPFD, a flow rate of 500  $\text{mmol s}^{-1}$  and at a [CO<sub>2</sub>] of 400 ppm.

A/C<sub>i</sub> curves with chlorophyll fluorescence determinations were conducted in fully expanded leaves from each species (n=3). The response of A to C<sub>i</sub> was constructed by measuring these values at a range of CO<sub>2</sub> concentrations from 70 to 1500 ppm.

The next gas exchange parameters have been measured in this Thesis:

- Light saturated net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A_{\text{sat}}$ ;  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; Exp. I, II and III)
- Stomatal conductance ( $g_s$ ;  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; Exp. I, II and III)
- Transpiration ( $T$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; Exp. II and III)
- Maximum carboxylation velocity of Rubisco ( $V_{c, \text{max}}$ ;  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; Exp. II and III)
- Maximum electron transport rate contributing to RuBP regeneration ( $J_{\text{max}}$ ;  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; Exp. II and III)
- Stomatal limitation, which is the proportionate decrease in light-saturated net CO<sub>2</sub> assimilation attributable to stomata ( $l$ , %; Exp. II and III)

Estimations of these three last parameters were calculated according to McMurtrie and Wang (1993) by fitting a maximum likelihood regression below and above the inflexion of the A-C<sub>i</sub> response.

- Instantaneous Water Use Efficiency ( $i\text{WUE}$ ; Exp. II and III), which is defined as the ratio of the rate of carbon assimilation ( $A_{\text{sat}}$ ) to the transpiration rate ( $T$ ), was calculated as:

$$i\text{WUE} = A_{\text{sat}} (\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}) / T (\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1})$$

The next fluorescence parameters have been measured in this Thesis:

- Maximum quantum yield of PSII ( $F_v/F_m$ ; Exp. II and III)
- Efficiency of excitation energy capture by open PSII reaction centres ( $F'_v/F'_m$ ; Exp. II and III)
- Relative quantum yield of photosystem II ( $\phi_{PSII}$ ; Exp. II and III)
- Photochemical quenching ( $q_p$ ; Exp. II and III)
- Non-photochemical quenching (NPQ; Exp. II)

These parameters were determined in a totally expanded leaf after 30 min of dark adaptation (Nogués and Baker, 2000)

In experiment Ia measurements were carried out in each clone and treatment (n=3) at the beginning of the experiment (T0) and every fifteen days (T15, T30, T45, T60) between 10:00 and 18:00 h and VPD average was 2.37 (kPa) at T0, 2.93 (kPa) at T15, 2.39 (kPa) at T30, 2.71 (kPa) at T45 and 2.62 (kPa) at T60. The experiment began late March 2013. T0 was done the previous days and measurements at regular time intervals were made on April, 12-13 (T15) and 27-28 (T30), May, 13-14 (T45) and June, 2-3 (T60).

In experiment Ib, UB measurements were carried out after 120 days (Ti) and 180 days (Tf) in the conditions described above. Gas exchange was measured on the third fully expanded leaf at the moment of maximum intensity of solar radiation from 12:00 to 14:00 and after 63 and 116 days after transplanting (referred as Ti and Tf) at UNICT. Maximum air temperature at UNICT (as average of measurements) was 33.8°C at Ti and 32.9°C at Tf; average PARi and average VPD were 1664.2  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  of PPFD and 3.68 (kPa) at Ti and 1564.8  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  of PPFD and 3.46 (kPa) at Tf, respectively and 2.37 (kPa) at Ti and 2.62 (kPa) at Tf at UB.

In experiment IIa, firstly  $A/C_i$  curves were measured at the beginning of the experiment (T0). Secondly, during the experiment, instantaneous measurements of assimilation  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  were done in each species and treatment (n=3) every fifteen days. All gas exchange and fluorescence measurements were made between 10:00 and 18:00h. The experiments started on the 1<sup>st</sup> of April 2013. Measurements before the experiment were

done on previous days, and instantaneous measurements were undertaken on April 12-13 (T15) and 27-28 (T30) and on May 13-14 (T45) and June 2-3 (T60).

In experiment IIb, measurements of gas exchange were carried out as described in experiment IIa. Photosynthesis activation time depended on the treatment duration: 30, 45 and 60 minutes for treatments whose durations were 3, 6 and 9 days, respectively.

In experiment III,  $A/C_i$  curves with chlorophyll fluorescence determinations were conducted at the beginning of the experiment ( $T_i$ ; see Exp. IIa). After 21 days ( $T_f$ ) of water stress treatments,  $A/C_i$  curves with chlorophyll fluorescence were also conducted in each treatment of both species.

### **3.3.1.2.- Relative water content (RWC; Exp. I, II and III)**

Relative water content (RWC, %) of the leaves was determined as  $(FW-DW)/(TW-DW) \times 100$ , where FW is the fresh weight, DW is the dry weight after being dried in an oven at 60°C until constant weight and TW is the turgid weight of the leaf after equilibration in distilled water for 24 h at 4°C.

In experiments I and II, RWC was calculated as the mean of three leaves of each clone and treatment every fifteen days, whereas in experiment III, RWC was calculated as the mean of three leaves for each specie in each treatment at the end of the experiment ( $T_f$ ).

### **3.3.1.3.- Chlorophyll content (Exp. I and II)**

Chlorophyll content was measured in the first or second last fully expanded leaf of plants using a portable meter (Minolta SPAD 502 Meter, Plainfield, IL, USA) every fifteen days. Five measurements were performed per leaf from the middle of the leaf (each measurement is the mean of 6 leaves per treatment).

### **3.3.1.4.- O<sub>2</sub> consumption, CO<sub>2</sub> production and respiratory quotient (RQ; Exp. IIb)**

O<sub>2</sub> consumption ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) was measured with a complete system with a liquid-phase oxygen electrode and dissolved oxygen measurement (Qubit Systems, Kingston, Canada, with data recording with LoggerPro 3.7 software).

10 cm<sup>2</sup> of tissue of the middle part of the leaf were sliced into small fragments in a CaCl<sub>2</sub> solution (0.2mM) over 10-15 minutes at room temperature and in darkness in order to stabilize the walls damaged by the wound. Afterwards, the leaf material was introduced into the electrode cuvette with a volume of 5 ml of TES buffer (20mM TES + 2mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.2), and the whole setup was ambient-air equilibrated under dark conditions. The reaction was carried out at 25 °C with constant stirring.

CO<sub>2</sub> production (µmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) was measured with NaOH and phenolphthalein indicator (protocol modified and adapted from Sinclair et al. (1945)).

The nature of the respiratory substrate was determined by the respiratory quotient (RQ), which is the ratio of CO<sub>2</sub> production to O<sub>2</sub> consumption:

$$RQ = CO_2_{production} / O_2_{consumption}$$

### **3.3.2.- Biomass parameters (Exp. I, II and III)**

Biomass parameters were measured at the end of the experiments: T60 in experiment Ia and Tf in experiment Ib, IIa, IIb, and III. Height (H; cm), number of stems (NS) and number of green leaves (NGL) in experiment III was measured also at the beginning of the experiment (Ti).

In every experiment, whole plants were harvested, weighed and oven dried at 60°C until constant weight was reached. Subsequently, the dry biomass of shoots and roots was determined. Total fresh weight and plant leaf area were estimated prior to drying using a flat-bed scanner (Hewlett-Packard ScanJet model licx, San Diego, USA) and analysed with an image processing program (Image, University of Sheffield, 2003).

Biomass parameters measured in all the experiments (Exp. I, II and III) were:

- Height along the longest stem from the base to the latest totally expanded leaf (*H*; cm)
- Number of leaves (NL)
- Number of stems per plant (NS)
- Green leaf area (gLA; m<sup>2</sup>)

- Stem area (SA; m<sup>2</sup>). Stem area was calculated from the formula for calculating the area of a cylinder, where the height was the stem height and an average (n=3) of the diameter was measured with a caliper.
- Total dry weight (TDW; g),

The percentage of complete green, complete yellow and complete dry leaves (GLP, YLP, DLP, respectively; %) were also measured in experiments I and II.

Moreover, some physiological indices were calculated:

- Shoot/Root ratio (S/R; g g<sup>-1</sup>), which is the quotient of the dry weight of the shoots by the dry weight of the roots.
- Leaf Mass Area (LMA; Kg m<sup>-2</sup>), which is defined as the ratio between leaf mass and leaf area.
- Specific Leaf Area (SLA, m<sup>2</sup> Kg<sup>-1</sup> dry leaves), which is defined as the ratio of leaf area to leaf dry mass. SLA is the inverse of the Leaf Mass Area (LMA).
- Leaf Area Ratio (LAR; m<sup>2</sup> Kg<sup>-1</sup> total dry weight), which is the leaf area per unit total plant biomass.
- Leaf Weight Ratio (LWR; Kg dry leaves Kg<sup>-1</sup> total dry weight), is expressed as the dry weight of leaves to whole plant dry weight.

### **3.3.3.- Stress susceptibility index (SSI; Exp. Ia and Ib)**

A stress index was calculated in order to classify the clones of *A. donax* L. according to their response to salinity and water stress in plants grown in controlled environmental conditions.

In order to identify the most important parameters to be used in the index, a factorial analysis (principal component analysis, PCA) was carried out. Once the most important and common parameters in experiment Ia and experiment Ib ( $A_{\text{sat}}$ ,  $g_s$ , GLP, TDW, S/R, SLA) were selected, SSI was calculated using the following relationship (Fischer and Maurer, 1978) for each treatment and clone.

$$\text{SSI} = [(1 - (Y_s / Y_p))] / [(1 - (X_s / X_p))]$$

where  $Y_s$ ,  $Y_p$ ,  $X_s$  and  $X_p$  represent parameter under stress, parameter under non-stress conditions for each clone, parameter mean in stress and parameter mean under non-stress conditions for all clones, respectively. An average of the results was done in order to classify clones for their tolerance or sensitivity to different stresses.

### 3.3.4.- Isotope determinations (Exp. III)

#### 3.3.4.1.- $^{13}\text{C}$ and $^{15}\text{N}$ labelling procedures

A double labelling with  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  was conducted in both species in a controlled environment chamber (Conviron E15, Controlled Environments Ltd., Winnipeg, Manitoba, Canada). Plants were kept inside the camera for an acclimation period of 3 days at a  $\text{CO}_2$  concentration of 400 ppm,  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  of PPFD during a 16 hours light period, and a relative humidity of 70-80% with a temperature regime of 25/18°C (light/dark).

Air samples were taken before labelling and the  $\delta^{13}\text{C}$  of the air inside the Conviron chamber was measured ( $\delta^{13}\text{C} -11.44 \pm 0.12\%$ ). Commercial  $^{13}\text{CO}_2$  was used to enrich the air inside the Conviron chamber with 99.9%  $^{13}\text{C}$  (Euriso-top, Saint-Aubin, France). Air was introduced into the camera with a 50ml syringe (SGE, Ringwood, Australia) placed on a syringe pump (IV Perfusor, Spritze) at a rate of  $12.5^{13}\text{CO}_2 \text{ ml h}^{-1}$ . This system allowed homogenous labelling through the day. The  $\delta^{13}\text{C}$  inside the camera during labelling was  $360 \pm 31\%$  for *A. donax* L. and  $180 \pm 22\%$  for *P. virgatum* L. The  $^{13}\text{C}$  labelling time was calculated according to the net assimilation rates of both species in each treatment, assuming that all species assimilate the same amount of labelled  $\text{CO}_2$  (ca.  $3000 \pm 85$  and  $4500 \pm 203 \text{ mmol C m}^{-2}$  for *A. donax* L. and *P. virgatum* L., respectively; Nogués et al., 2014). The  $\delta^{13}\text{C}$  of air samples were determined by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS), as described in Nogués et al. (2008) at the Centros Científicos y Tecnológicos of the University of Barcelona.

The  $^{15}\text{N}$  labelling was also applied during the same  $^{13}\text{C}$  labelling period by replacing the  $^{14}\text{N}$  in the Hoagland solution by  $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$  enriched with  $^{15}\text{N}$  5.31% (Cortec Net, France). The  $\delta^{15}\text{N}$  of the solution was  $1.4 \pm 1.7 \%$ .

Stress conditions were kept during the labelling period (i.e. C plants were fully irrigated whereas MS and SS plants were kept under 50 and 25% of FC, respectively). After labelling,  $^{15}\text{N}$  was removed by washing the substrate with distilled water. Plants were then irrigated with normal Hoagland solution.

Isotopic analysis samples were taken at different times: T0, pre-labelling; T1: 24 h after the end of the labelling and T2: 7 days after the end of the labelling.

#### **3.3.4.2.- $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of total organic matter ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{TOM}}$ ) and total C and N content ( $\text{C}_c$ and $\text{N}_c$ )**

Leaf, shoot, rhizome and root samples were collected on the T0, T1 and T2, dried at 60°C until constant weight, and analysed for the C isotopic composition of Total Organic Matter ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$ ). A ground sample of 0.8 mg was weighed in a tin capsule and used for each determination, and three replicates were analysed for each treatment. The  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ratios (R) of plant material and total C and N content ( $\text{C}_c$ , % C  $\text{g}^{-1}\text{DM}$  and  $\text{N}_c$ , % N  $\text{g}^{-1}\text{DM}$ ) were determined using an elemental analyser (EA1108, Series I; Carlo Erba Instrumentazione, Milan, Italy) coupled to an isotope ratio mass spectrometer (Delta C; Finnigan, Mat., Bremen, Germany) operating in continuous flow mode at the Centros Científicos y Tecnológicos of the University of Barcelona.  $\text{C}_c/\text{N}_c$  ratio was estimated in each organ on a dry mass basis.

#### **3.3.4.3.- $\delta^{13}\text{C}$ determination of total soluble carbohydrates sugars ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{TSS}}$ )**

The extraction procedures for Total Soluble Sugars (TSS) were similar to those described by Nogués et al. (2004). Leaf powder (50 mg) was suspended with 1 mL of distilled water in an Eppendorf tube (Eppendorf Scientific, Hamburg, Germany). After centrifugation, starch was removed from the pellet by HCl solubilisation. Soluble proteins of the supernatant were heat denatured and precipitated. Then TSS of the proteinless extracts were collected and transferred to tin capsules for isotope analysis. Isotope analysis of TSS were conducted using the same EA-IRMS described above.

#### **3.3.4.4.- $R_d$ and $\delta^{13}\text{C}$ of dark-respired $\text{CO}_2$ determination ( $\delta^{13}\text{C}_R$ )**

Prior to the dark respiration determinations, the plants were dark-adapted for 45 min in a dark room. Plant organs (i.e. leaf, shoot, rhizome and root) were separately placed in a plastic gas analysis chamber to determine the  $\delta^{13}\text{C}$  of dark respired  $\text{CO}_2$  ( $\delta^{13}\text{C}_R$ ). In the case of rhizome and root respiration analysis, they were cleaned and immediately dried on paper before putting inside the chamber. Determinations of dark respiration ( $R_d$ ;  $\text{mmol gDW}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) were conducted in a plastic chamber ( $20 \times 12 \times 6 \times 10^{-6} \text{ m}^3$ ) with two fans, and connected to a Li-6400 photosynthesis system (Li-Cor, Lincoln, NE, USA). Ingoing air was passed through the chamber at a rate of  $500 \text{ ml min}^{-1}$  and temperature in the chamber was maintained at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . The PPFD inside the chamber was maintained at  $0 \text{ } \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  by covering the entire system with a black cover. The gas analysis chamber, included in the closed system, was first flushed with  $\text{CO}_2$ -free air to ensure that only the  $\text{CO}_2$  respired in the chamber was accumulated. The  $\text{CO}_2$  concentration inside the chamber was measured using the Li-6400. After 5 minutes,  $\text{CO}_2$  samples were collected with a 50 ml syringe (SGE, Ringwood, Australia) and immediately injected into a 10 ml vacutainer (BD Vacutainers, Plymouth, UK). The vacutainers were over-pressurised with  $\text{N}_2$  to avoid retro-diffusion of ambient  $\text{CO}_2$  into the syringe. The  $\delta^{13}\text{C}$  of air samples were also determined by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS), as described in Nogués et al. (2008) at the Centros Científicos y Tecnológicos of the University of Barcelona.

#### **3.3.4.5.- Calculations**

The  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios (R) of TOM and air samples and the  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ratios (R) of TOM were expressed as  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  values using international secondary standards of known  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios (IAEA CH7 polyethylene foil, IAEA CH6 sucrose and USGS 40I-glutamic acid) calibrated against Vienna Pee Dee Belemnite calcium carbonate (VPDB) with an analytical precision of  $0.1\text{‰}$  and  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  ratios (IAEA  $\text{N}_1$  and IAEA  $\text{N}_2$  ammonium sulphate and IAEA  $\text{NO}_3$  potassium nitrate) referred to  $\text{N}_2$  in air, with an analytical precision of  $0.2\text{‰}$ .

$$\delta^{13}\text{C} \text{ or } \delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = (R_{\text{sample}} / R_{\text{standard}} - 1) * 1000$$

The carbon ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) and nitrogen ( $\Delta^{15}\text{N}$ ) isotope discrimination was calculated on TOM from the isotope compositions  $\delta_a$  and  $\delta_p$  (Farquhar et al., 1989) as:

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

where subscripts “a” and “p” refer to air and TOM, respectively.

### 3.4.- Statistics

The means ( $n=3$ )  $\pm$  standard errors (SE) were calculated for each parameter. The statistical analysis was conducted with the SPSS 21.0 software package (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Data averages of each treatment were plotted and were subjected to two or three ANOVA factors (depending of the experiment). Dependent variables were checked for normality and homoscedasticity. When a particular F-test was significant, we compared means using a Tukey multiple comparison. The results were accepted as significant at  $P < 0.05$ .



## **RESULTS**



#### **4.1.- Experiment I: “Salinity and water stress effects on biomass production in different *Arundo donax* L. clones”**

##### **4.1.1.- Experiment Ia: Screening for salinity and water stress (UB)**

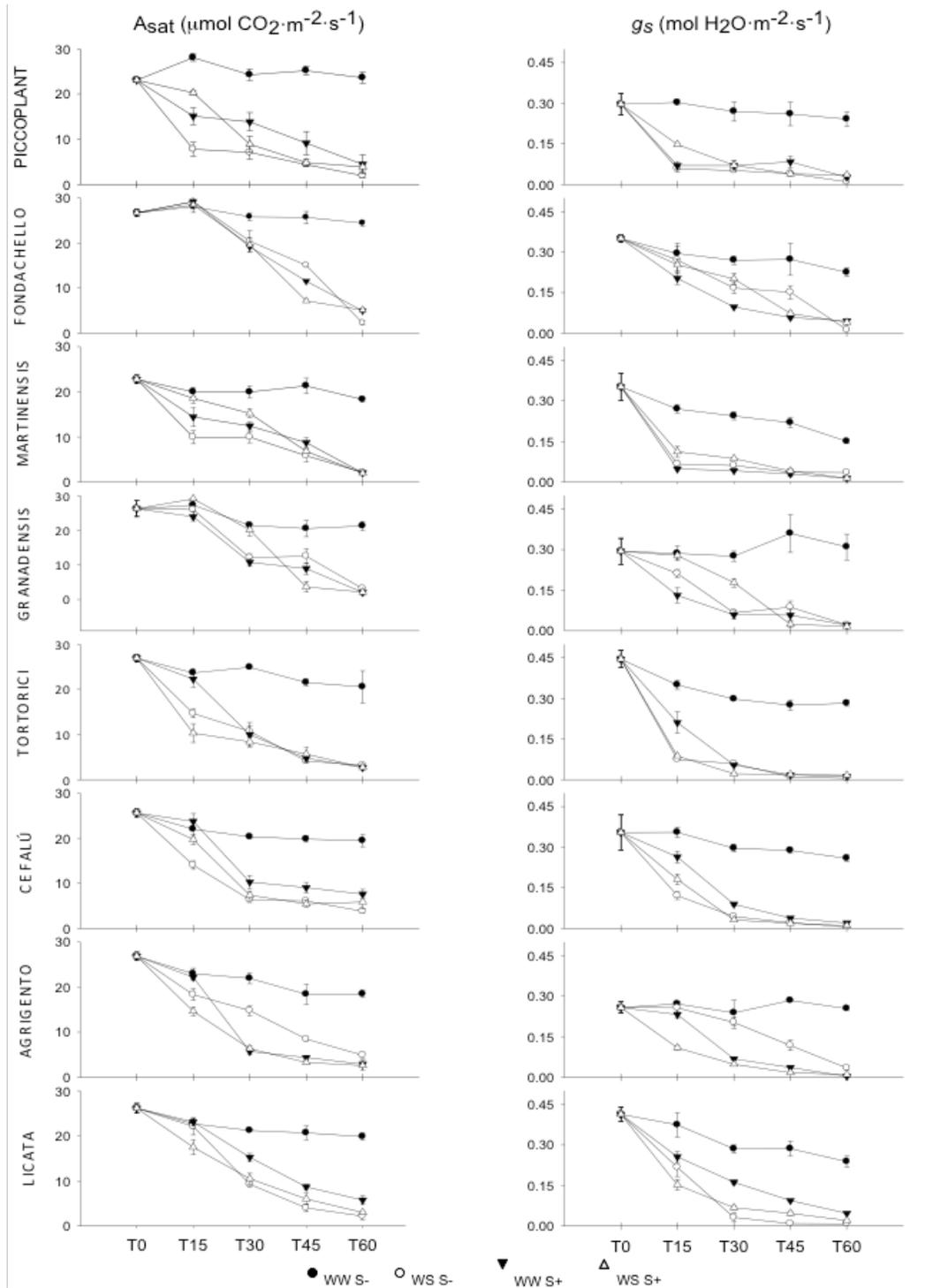
##### **4.1.1.1.- Gas exchange**

Significant differences were found for  $A_{sat}$  ( $P = 0.014$ ) and  $g_s$  ( $P = 0.010$ ) between clones at the beginning of the experiment (T0). Granadensis, Tortorici, Agrigento, Fondachello and Cefalú showed the highest values of  $A_{sat}$  (Fig. 4.1.1) whereas Piccoplant and Martinensis showed the lowest values. In general,  $A_{sat}$  and  $g_s$  decreased slightly in the control treatment (WW S-) for almost every clone during the experiment (Fig. 4.1.1). Significant differences in  $A_{sat}$  and  $g_s$  were found between measuring periods, treatment, clone and interactions. A highly positive and significant correlation was found between  $A_{sat}$  and  $g_s$  during the experiment ( $R^2 = 0.886^{**}$ ; correlation was significant at  $P < 0.01$ ). For each of the four treatments and across the set of 8 clones, we studied the linear correlation of  $g_s$  against  $A_{sat}$  and time.  $A_{sat}$  and  $g_s$  were strongly and positively correlated ( $P = 0.001$ ) in the water stress (WS) treatments (WS S-;  $R^2 = 0.909$  and WS S+;  $R^2 = 0.954$ ) and remained positively correlated in the salinity (S) treatment (WW S+;  $R^2 = 0.844$ ). Both parameters were negatively correlated with time in each treatment, with the correlation being slightly stronger for  $A_{sat}$  than  $g_s$ . In the control treatment the correlations were less significant (Supplementary Material, SM 1.1).

$A_{sat}$  and  $g_s$  markedly decreased at T60 (between 70% and 91%) in every stress treatment for each clone ( $P = 0.001$ ) in relation with T0 (Fig. 4.1.1). In general, all clones showed lower values of  $A_{sat}$  and  $g_s$  at T15 in all stress treatments apart from Fondachello and Granadensis, where no significant differences were found in any treatments with respect to the control. At T30 Fondachello showed higher values of  $A_{sat}$  in each stress treatment in comparison to the other clones. In contrast, Cefalú showed the lowest values in WS S- and Agrigento in both WW S+ and WS S+. As a whole, similar decreases were observed in each clone at T45. In the WS S+ treatment, a large decrease was observed in Fondachello and Granadensis between T30 and T45.

Interestingly, some clones (Piccoplant, Martinensis, Cefalú, Licata) seemed to be more affected by *WS* (*WS S-*) than by *S* treatments (*WW S+* and *WS S+*) during the first month of the experiment, according to their low  $A_{sat}$  values (Fig. 4.1.1). However, no differences in  $A_{sat}$  between treatments were found at the end of the experiment ( $T_{60}$ ;  $P = 0.325$ ). Some clones (Martinensis, Granadensis and Tortorici) showed similar values whereas others were more affected by one of the stresses. Piccoplant, Licata and Fondachello underwent the greatest decrease in  $A_{sat}$  with respect to the value at  $T_0$  in *WS S-* (92%, 91% and 91%, respectively) while Agrigento decreased by only 82%. *WW S+* had less effect on Cefalú, Licata and Piccoplant (70%, 78% and 81%, respectively), whereas Granadensis was substantially affected (92%). In relation to *WS S+*, Granadensis was the most affected clone (92%), while Cefalú, Fondachello and Piccoplant were the least affected, decreasing by only 77%, 81% and 83% with respect to the  $T_0$  values.

However, different clones had different performances under stress over time. Whereas some ecotypes (Granadensis, Fondachello and Licata) showed negligible stress effects with respect to the control until  $T_{30}$ , other clones (Piccoplant, Martinensis, Tortorici and Agrigento) were most affected with short-term stress, especially by *WS* treatments. Over the short term ( $T_{15}$ ), no *S* effect was found in the clones except for Piccoplant and Martinensis. As expected, after a month ( $T_{30}$ ) the stress effect in plants was higher, although no clear pattern was found between treatments: Piccoplant, Cefalú and Licata were the less affected by *S*, Martinensis and Granadensis were less affected by both stresses and Fondachello was equally affected by *S*, *WS* and both stresses. The effect of both stresses was notable at  $T_{45}$  in some clones. Although clones seemed to be more affected by *WS* than by *S* at  $T_{60}$ , no significant differences between treatments were found in Martinensis, Granadensis and Tortorici.

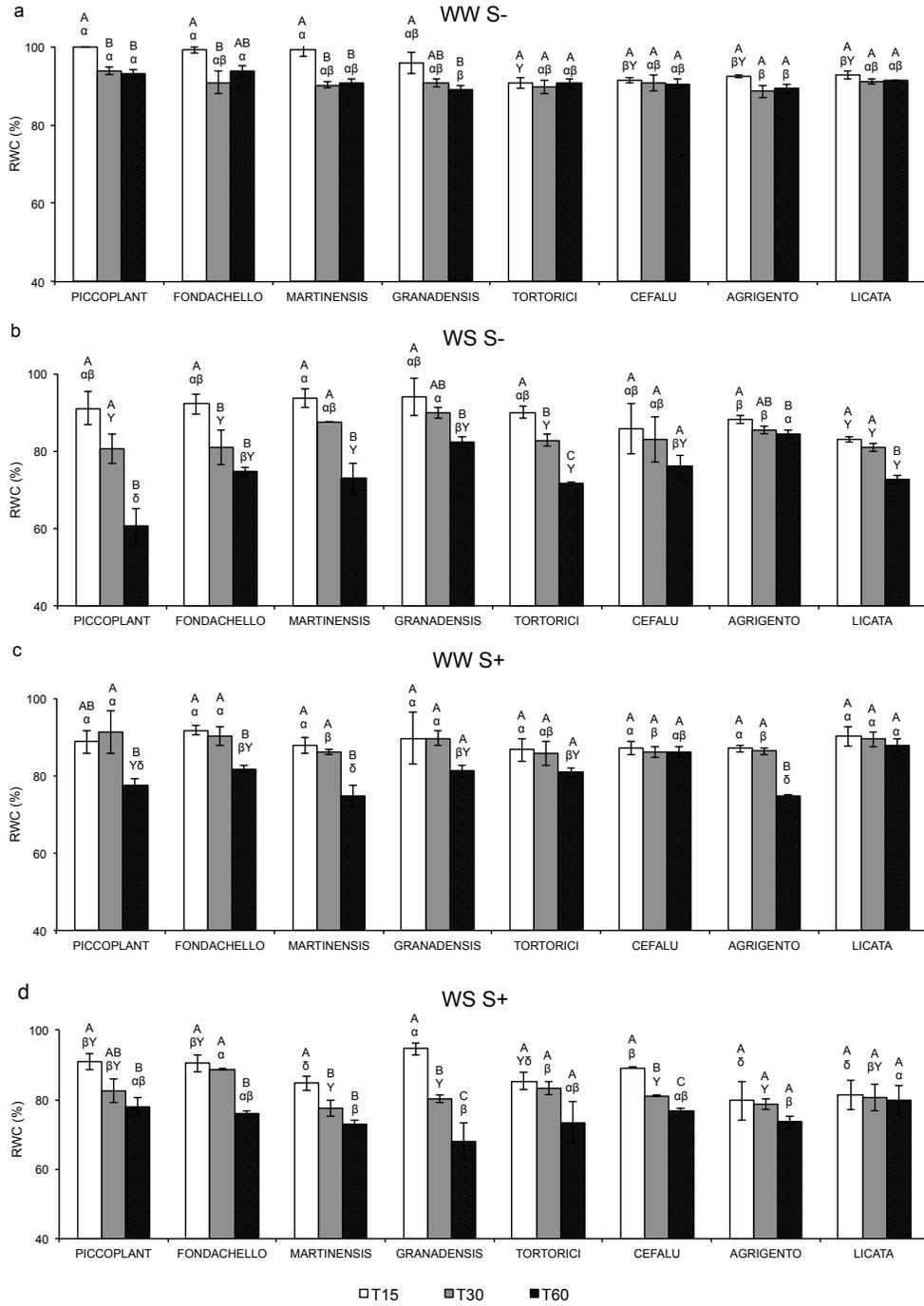


**Fig. 4.1.1.-** Changes in  $A_{sat}$  and  $g_s$  during T0, T15, T30, T45 and T60 in each clone, respectively for each treatment (WW S-, WS S-, WW S+ and WS S+). Data are the means of three replicates and the standard errors (SE) are shown when larger than the symbols.

#### **4.1.1.2.- Relative water content (RWC)**

Significant differences at T0 ( $P = 0.004$ ) were found between clones, with Fondachello and Granadensis having the highest and lowest values of RWC, respectively (Fig. 4.1.2). A trend of decreasing RWC was found in most of the eight clones of *A. donax* L. subjected to stress over the experiment, although the differences were not significant in some clones. Significant differences were found between treatments and time ( $P < 0.0001$  in each case). A significant decrease was observed for each time (T15, T30 and T60) in relation to T0. The decrease in RWC in WS treatments was greater than under WW S+ (24%, 17% and 23% in WS S-, WW S+ and WS S+, respectively).

Each clone sustained a decrease in RWC under WS S- (Fig. 4.1.2b) except Cefalú, where no significant differences were found ( $P = 0.469$ ). At T60, the RWC of Piccoplant decreased by 38%, while in Agrigento and Granadensis it decreased by only 13% and 16% with respect to the values at T0. Some clones (Granadensis, Tortorici, Cefalú and Licata) did not show a significant decrease in RWC throughout the WW S+ treatment (Fig. 4.1.2c), while the decrease in other clones (Piccoplant, Fondachello, Martinensis and Agrigento) was significant only at T60. Agrigento and Martinensis showed a greater decrease at T60 with respect to T0 (with 23% for both), whereas Licata and Cefalú only decreased by 10% and 12%, respectively. A similar pattern was observed for the WS S+ treatment in some clones (Tortorici, Agrigento and Licata), where no significant differences were found over time (Fig. 4.1.2d). Others, such as Piccoplant, Fondachello, Martinensis, Granadensis and Cefalú, showed a decrease in RWC to some extent. Granadensis was the clone with the greatest decrease relative to T0, whereas Licata had the smallest decrease (30% and 18%, respectively). Significant and positive linear correlations were found between  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  and RWC throughout the experiment ( $R^2 = 0.688^{**}$  and  $R^2 = 0.636^{**}$ , respectively).



**Fig. 4.1.2.-** Changes in relative water content (RWC) during T15, T30 and T60 in each clone for each treatment (WW S- (a); WS S- (b); WW S+ (c) and WS S+ (d)). Data are the means of three replicates and the standard errors (SE) are shown when larger than the symbols. Data were analysed with an ANOVA Tukey analysis. Different capital letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between time for the same clone and treatment. Different Greek letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between clones for the same time and treatment.

#### **4.1.1.3.- Chlorophyll content**

A decrease was observed in all treatments relative to the control at T60, being most important in treatments involving WS (23% in WS S- and 22% in WS S+) whereas S treatment decreased only 14% with respect to the control.

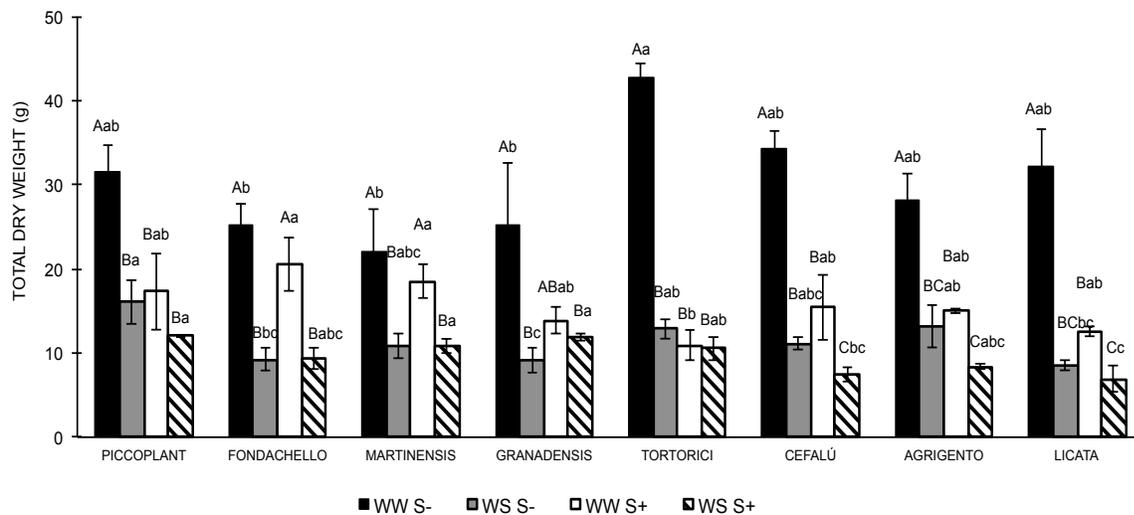
Piccoplant, Fondachello and Cefalú underwent a decrease in chlorophyll content under WW S- between T0 and T60 (SM 1.2). At T60 significant differences were found between treatments in each clone. A smaller decrease in chlorophyll content was observed under WW S+ than in WS S- and WS S+. Fondachello, Granadensis, Cefalú, Agrigento and Licata showed a similar pattern between WS S- and WS S+, while Piccoplant, Tortorici and Martinensis were more affected by WS S- than by WS S+. Relative to their own chlorophyll content at T0, Cefalú was the most affected by WS S- and WS S+, decreasing by 45% and 44%, respectively, while Agrigento was the most affected by S (WW S+), decreasing by 34% at T60, and was also the clone with the lowest chlorophyll content values in that treatment (SM 1.2). Positive and significant correlations were found between chlorophyll content and  $A_{\text{sat}}$  (0.459\*\*), SLA (0.541\*\*) and TDW (0.453\*\*); SM 1.3).

#### **4.1.1.4.- Biomass parameters**

In general, NS was affected by the treatments, especially WS S+ relative to WW S-. Only three clones (Tortorici, Cefalú and Agrigento) showed differences between treatments although no significant differences were observed in the other clones (Table 4.1.1). Plant height ( $H$ ; cm) and stem diameter (SD; cm) were different according to the treatment, being higher under WW S- ( $73.0 \pm 4.0$  and  $0.7 \pm 0.02$ , respectively) than in the other treatments. A greater decrease in  $H$  and SD was observed in WS S- ( $54.2 \pm 3.5$  and  $0.6 \pm 0.02$ , respectively) and WS S+ ( $48.7 \pm 3.5$  and  $0.6 \pm 0.02$ , respectively) than in WW S+ ( $59.2 \pm 3.9$  and  $0.63 \pm 0.03$ , respectively).



Parameters related to leaf development such as NL, gLA, GLP, DLP and TDW were more affected by WS S- and WS S+ than by WW S+ (Table 4.1.1). The gLA was reduced significantly in each treatment with respect to the control, but there were no significant differences between WS S- (84%) and WS S+ (81%). Martinensis and Fondachello showed the lowest values in WW S-. Under WS S- conditions, Cefalú had the largest decline (93%) followed by Tortorici (90%), Licata (86%) and Piccoplant (86%), whereas the smallest decline was observed in Granadensis (78%) and Agrigento (75%). Tortorici and Agrigento were the most affected by WW S+ (71% and 69%, respectively) whereas Cefalú and Martinensis were the least affected (59% and 48%, respectively). Licata was most affected by both stresses (WS S+) with a reduction of 89% followed by Cefalú (88%) and Agrigento (86%), whereas Piccoplant, Granadensis and Martinensis were less affected (73%, 73% and 66%, respectively). TDW (Fig. 4.1.3) declined by 61% and 66% in WS S- and WS S+, respectively, whereas WW S+ decreased by only 46%, relative to the control treatment (Fig. 4.1.3).



**Fig. 4.1.3.-** Changes in total dry weight (TDW, g) at T60 in each clone for each treatment (WW S-, WS S-, WW S+ and WS S+). Data are the means of three replicates and the standard errors (SE) are shown when larger than the symbols. Data were analysed with an ANOVA Tukey analysis. Different capital letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments for a same clone and different small letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between clones for the same treatment.

In general, the Shoot/Root ratio ( $S/R$ ,  $\text{g g}^{-1}$ ) decreased in each treatment in comparison to the control, being the lowest in the  $WS$  treatment than in the combined stresses or  $S$  alone (Table 4.1.2). Moreover, the decrease in the  $S/R$  was due to a differential response to stress between shoots and roots. While shoot growth seemed to be more affected by  $WS$  relative to the control (69% for  $WS S-$ , 50% for  $WW S+$  and 71% for  $WS S+$ ), root growth seemed to be less affected (35% for  $WS S-$ , 43% for  $WW S+$  and 50% for  $WS S+$ ), although no significant differences were found in a Tukey test between treatments (except for the control; Table 4.1.2). Even so, the  $S/R$  data should be considered carefully because our experiment utilised potted plants, where root development is influenced by the size of the pots. Licata and Granadensis had the greatest decrease in the  $S/R$  under  $WS S-$  (71% and 69%) relative to the control and Martinensis the smallest (35%). The  $S/R$  was less affected by  $WW S+$ , with Piccoplant and Granadensis the being most affected, with 29% and 27% reductions, respectively, compared to the control. Both Martinensis and Cefalú showed increases in their  $S/R$  under this treatment ( $WW S+$ ) relative to the control (22% and 4%, respectively).  $WS S+$  had similar effects on some clones as  $WS S-$  (Piccoplant (52%), Granadensis (65%), Tortorici (41%)) although other clones (Licata (41%), Fondachello (35%), Agrigento (26%) and Martinensis (13%)) were less affected by both stresses than  $WS$  alone.

$WS$  had an important influence on the LAR and LWR, which decreased 58% and 41% respect to the control under  $WS S-$  and by 46% and 24% under  $WS S+$  (Table 4.1.2). In contrast,  $WW S+$  decreased these parameters by only 33% and 13%, respectively (Table 4.1.2). Similar to LAR and LWR, the SLA was more affected by treatments involving  $WS$  (32% in  $WS S-$  and 28% in  $WS S+$ ) than  $S$  (24%). A strong and positive correlation (SM 1.3), was found between SLA and  $A_{\text{sat}}$  (0.736\*\*) and between SLA and chlorophyll content (0.541\*\*; Bilateral significance at level  $P < 0.01$ ).



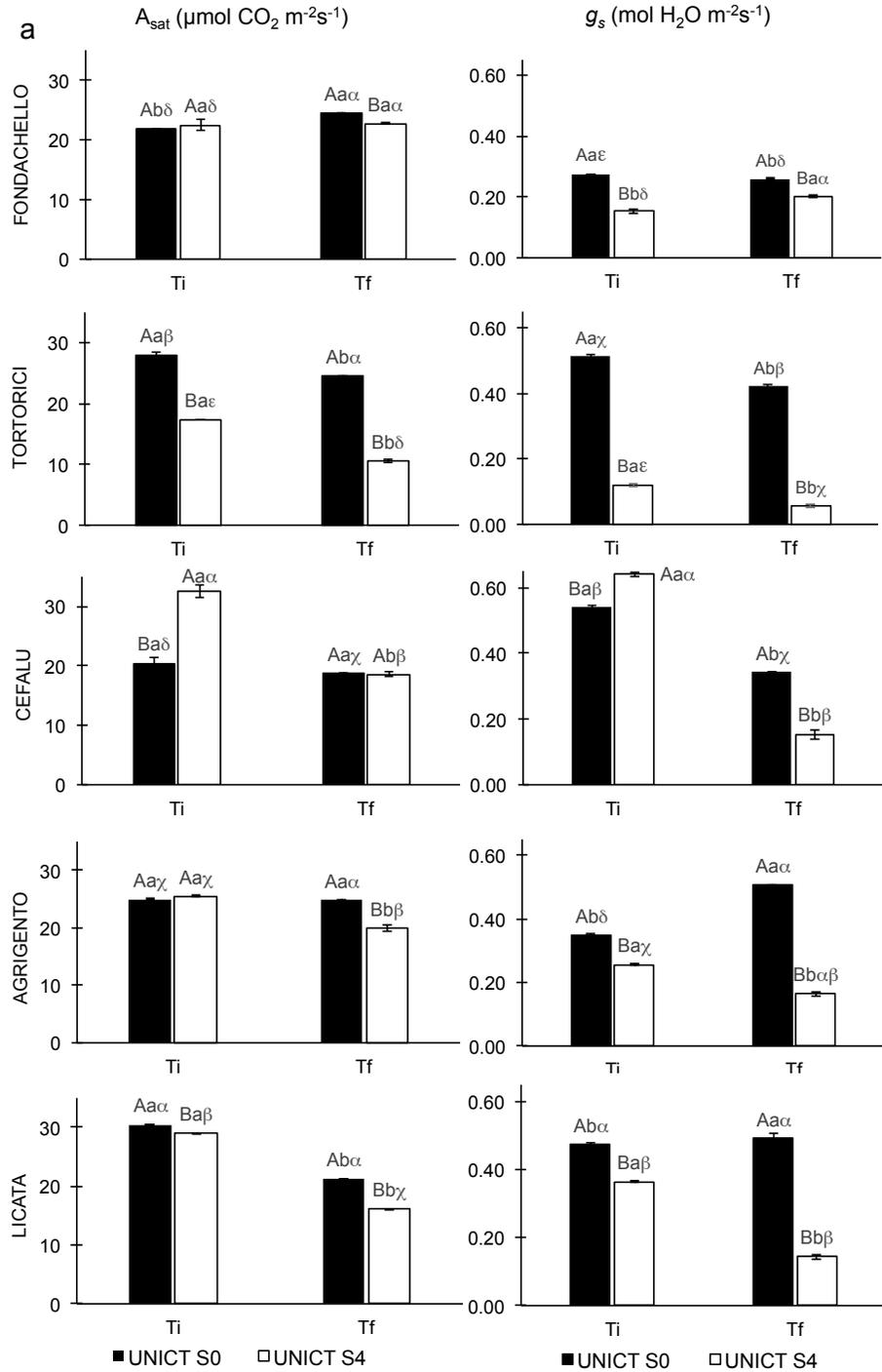
#### 4.1.2.- Experiment Ib: Screening for increasing salinity levels (UB, UNICT)

##### 4.1.2.1.- Gas exchange

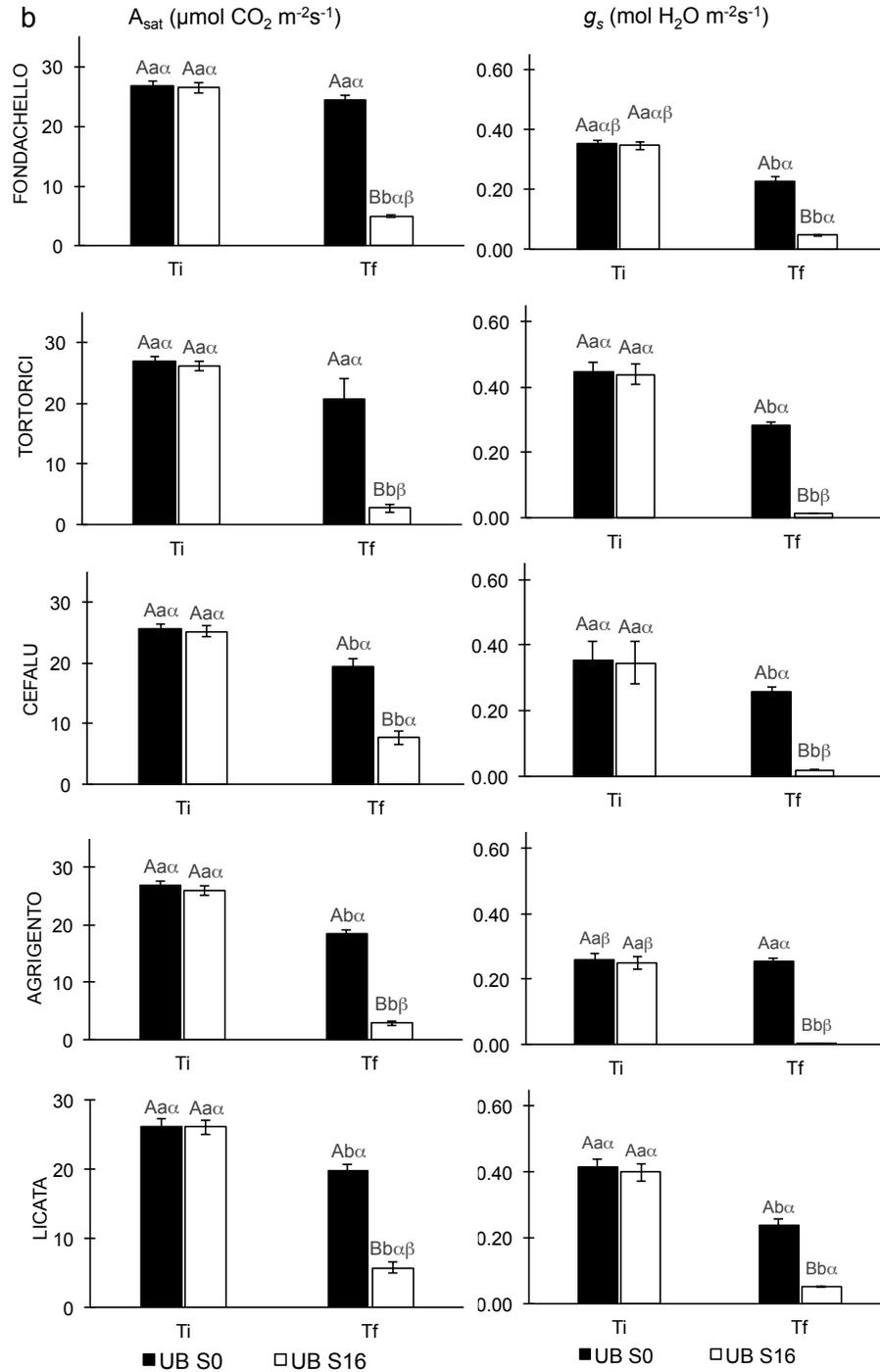
No significant differences were observed for  $A_{\text{sat}}$  between UNICT S0 and UNICT S4 at the initial time (Ti) in Fondachello and Agrigento (Fig. 4.1.4a). A decrease in the  $A_{\text{sat}}$  was found in Tortorici and Licata ( $P = 0.001$ ) although a surprising increase was found in Cefalú from  $20.5 \pm 1.0$  to  $32.5 \pm 1.0$ . Moreover, a decrease in  $g_s$  was observed in each clone ( $P = 0.001$ ) except Cefalú, which had an increase of 18.9% in  $g_s$  between UNICT S0 and UNICT S4 at Ti. On the other hand, no significant differences were found in  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  between UB S0 and UB S16 at Ti in any clone studied (Fig. 4.1.4b). A decrease in  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  was found between UNICT S0 and UNICT S4 at the end of the experiment (Tf) in each clone except in Cefalú, where there was no significant difference found in  $A_{\text{sat}}$  (Fig. 4.1.4a). Significant differences were also found in each clone in both parameters between UB S0 and UB S16 at Tf (Fig. 4.1.4b).

S treatment at Tf led to lower values of  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  at UB than at UNICT. A decrease in  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  was found in each clone in S treatments (S4 and S16) in both locations (Fig. 4.1.4a,b), except for Fondachello at UNICT where there was no significant difference found in  $A_{\text{sat}}$  ( $P = 0.809$ ) and an increase of 33% in  $g_s$  was observed.

Regarding the differences between clones, significant differences were found between them for  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  in most of the treatments. At Tf Fondachello had the highest  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  values at UNICT ( $22.7 \pm 0.1$  and  $0.203 \pm 0.004$  respectively) in S4 followed by Cefalú and Agrigento. Cefalú had the highest  $A_{\text{sat}}$  value at UB S16 ( $7.6 \pm 1.0$ ) followed by Fondachello ( $5.0 \pm 0.2$ ), with the latter having higher  $g_s$  values ( $0.046 \pm 0.002$ ) than Cefalú ( $0.020 \pm 0.001$ ).



**Fig. 4.1.4a** Changes in  $A_{sat}$  and  $g_s$  during Ti and Tf in each clone, respectively for each treatment (UNICT S0 and UNICT S4). Values are the mean of three replicates  $\pm$  standard error (SE). Different capital letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments for the same location and time, different small letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between time for a same location and treatment and different Greek letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between clones for the same treatment and location.



**Fig. 4.1.4b** Changes in  $A_{sat}$  and  $g_s$  at UB during Ti and Tf in each clone, respectively for each treatment (UB S0 and UB S16). Values are the mean of three replicates  $\pm$  standard error (SE). Different capital letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments for the same time, different small letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between time for the same treatment and different Greek letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between clones for the same treatment.

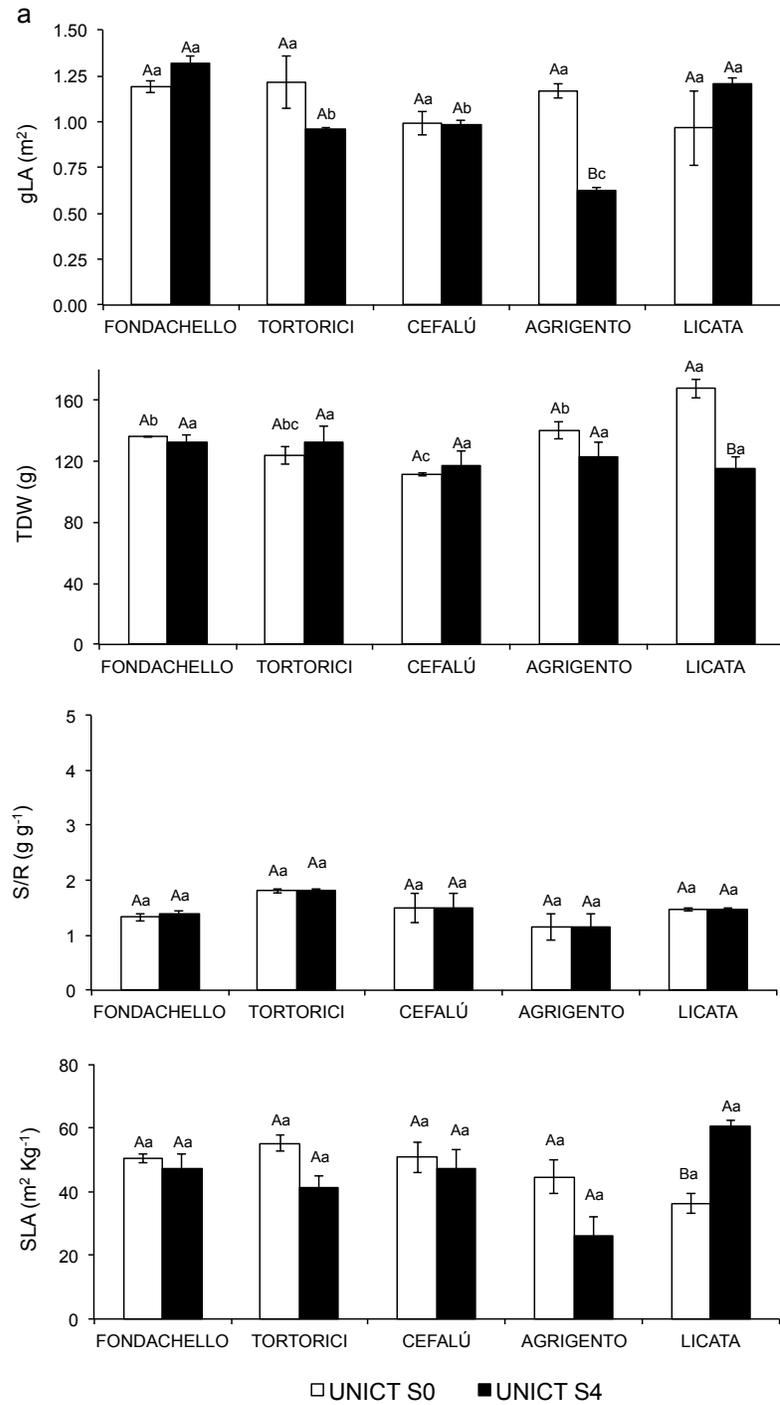
#### **4.1.2.2.- Chlorophyll content**

Different behaviour was observed between locations with respect to chlorophyll content (SM 1.4). An increase in chlorophyll content was observed in almost every clone at UNICT except for Tortorici, which had no significant differences between treatments (S0 and S4;  $P = 0.630$ ). Nevertheless, a decrease in chlorophyll content was observed in each clone at UB between the control (S0) and the S treatment (S16). Licata had the highest chlorophyll content at UNICT S0 whereas Fondachello, Tortorici and Licata had the highest chlorophyll content at UB S0 (SM 1.4a,b). Under the S treatment, Agrigento and Fondachello had the highest chlorophyll content values at UNICT S4, whereas Fondachello and Cefalú showed the highest values at UB S16. The Agrigento clone behaved differently at the two locations, showing the greatest increase between UNICT S0 and UNICT S4 (15%) and the greatest decrease between UB S0 and UB S16 (24%).

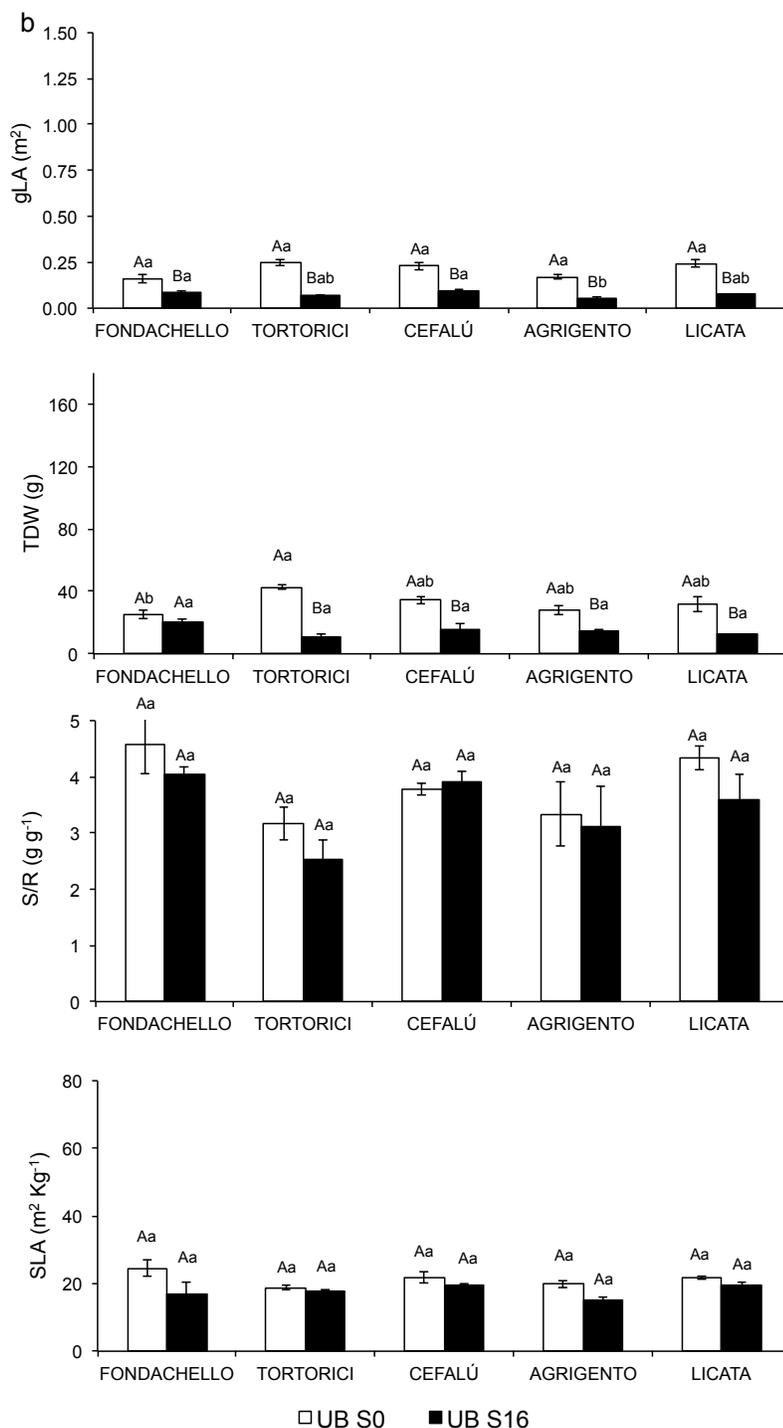
#### **4.1.2.3.- Biomass parameters**

No significant differences were found in the gLA (Fig. 4.1.5a) in most of the clones between UNICT S0 and UNICT S4, except for Agrigento (a decrease of 58.5%). Surprisingly, an increase in gLA was found in Fondachello (11%) and Licata (25%). In addition, a remarkable decrease in gLA was observed at UB (Fig. 4.1.5b), being most noticeable in Tortorici (71%) while Fondachello had the smallest decrease in gLA between UB S0 and UB S16 (47%).

No significant differences were found in TDW (Fig. 4.1.5a) between UNICT S0 and UNICT S4 in the majority of clones, apart from Licata, whereas significant differences were found between UB S0 and UB S16 in all clones except Fondachello. The TDW (Fig. 4.1.5b) was lower at UB, even in the control treatment (S0). Fondachello had the highest production in both locations. In relation to the S/R a decrease between control and S treatment was observed although no significant differences were found between treatments or even between clones (Fig. 4.1.5a, b). However, lower values of S/R were observed at UNICT for each clone than at UB. Tortorici had the highest S/R value at UNICT S4 while the highest value in UB S16 was found in Fondachello.



**Fig. 4.1.5a.-** Differences in gLA (m<sup>2</sup>), TDW (g), S/R (g g<sup>-1</sup>) and SLA (m<sup>2</sup> Kg<sup>-1</sup>) at T60 in each clone at UNICT and for each treatment (S0 and S4). Values are the mean of three replicates ± standard error (SE). Different capital letters indicate significant differences (*P* < 0.05) between treatments for the same location and clone. Different small letters indicate significant differences (*P* < 0.05) between clones for a same location and treatment.

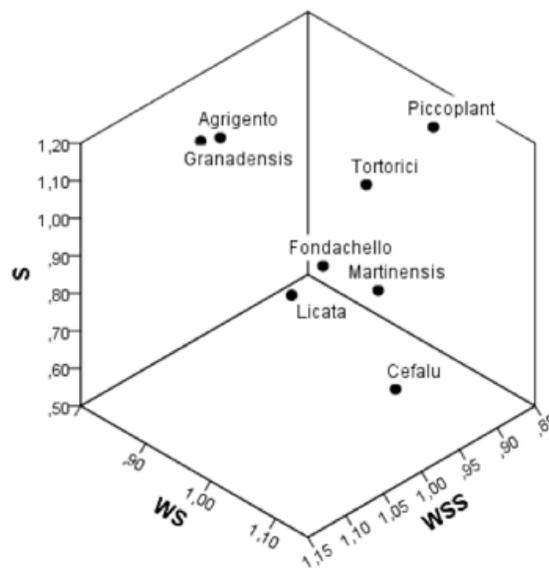


**Fig. 4.1.5b.-** Differences in gLA (m<sup>2</sup>), TDW (g), S/R (g g<sup>-1</sup>) and SLA (m<sup>2</sup> Kg<sup>-1</sup>) at T60 in each clone at UB (b) for each treatment (S0 and S16). Values are the mean of three replicates ± standard error (SE). Different capital letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments for the same location and clone. Different small letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between clones for a same location and treatment.

The behaviour of SLA was opposite to S/R (Fig. 4.1.5a, b), with no significant differences being observed between treatments (except for Licata at UNICT) or between clones in the same location. However, a tendency for SLA to decrease in line with increasing *S* was observed (except for Licata at UNICT). Moreover, lower SLA values were found at UB than at UNICT.

#### 4.1.3.- Stress susceptibility index (SSI; Exp. Ia y Ib)

After carrying out the principal component analysis (PCA), it was observed that the first two principal components explained 72.04% and 82.60% of variation. The most significant and positive parameters of component 1 (above 0.750) were selected: *g*<sub>LA</sub>, *GLP*, *NL*, *A*<sub>sat</sub>, *g*<sub>s</sub>, *LAR*, *TDW*, *RWC*, *SLA*, *SPAD* and *S/R* (SM 1.5) but only the common parameters in experiment Ia and experiment Ib (*A*<sub>sat</sub>, *g*<sub>s</sub>, *GLP*, *TDW*, *S/R*, *g*<sub>LA</sub>, *SLA*) were used in the calculation of the SSI.



**Fig. 4.1.6.-** 3-D graphic representing stress susceptibility index (SSI) of each clone according to water stress (*WS*; X axis), salinity (*S*; Y axis) and both stresses (*WSS*; Z axis). Higher SSI values indicate lower tolerance to stress.

The eight clones of *A. donax* L. in experiment Ia were classified according to SSI as shown in Fig. 4.1.6. Each axis represents the clone tolerance or sensitivity to stress (*WS* (X axis), *S* (Y axis) and both stresses (Z axis)). A higher SSI indicates lower tolerance to stress. Agrigento was the most tolerant to *WS* (SSI = 0.84) whereas its tolerance to *S* and both stresses was lower (1.08 and 1.00, respectively). Granadensis, Martinensis and Fondachello were also tolerant to *WS* (0.88, 0.92 and 1.01, respectively). However, Martinensis showed a higher tolerance to *S* (0.59) and both stresses (0.86) than Fondachello (0.92 and 1.01) and Granadensis (1.18 and 1.06, respectively). Moreover, Martinensis and Cefalú showed low SSI values in the *S* treatment (0.59 and 0.68, respectively), indicating a high tolerance to this stress. However, Cefalú's tolerance to *WS* and both stresses was significantly lower (1.11 and 1.00, respectively).

Martinensis, Piccoplant and Tortorici showed high tolerance to both stresses (0.86, 0.89 and 0.97, respectively), whereas Piccoplant's tolerance to *WS* was not noticeable (1.04). Martinensis seemed to have performed quite well under *WS*, *S* and both stresses, showing low SSI values in each treatment (0.92, 0.59 and 0.86, respectively). In contrast, the results for Licata indicate a poor response to stress with high SSI values for almost every treatment (1.09, 1.05 and 1.12, for *WS*, *S* and double stress respectively).

In relation to increasing *S* levels (SM 1.6), Fondachello recorded the lowest SSI for UNICT S4 (0.55) followed by Cefalú (1.40) and Licata (1.44), with the same three clones having similar low SSI values for UB S16 (0.99, 0.71 and 0.99, respectively). On the other hand, Agrigento (2.87 and 1.18) and Tortorici (2.01 and 1.04) had the highest SSI values for the UNICT S4 and UB S16 treatments, respectively.

## 4.2.- Experiment II: "The response of *Arundo donax* L. (C<sub>3</sub>) and *Panicum virgatum* L. (C<sub>4</sub>) to different stresses"

### 4.2.1.- Experiment IIa: Water stress and salinity

#### 4.2.1.1.- Gas exchange

Significant differences were found in almost every photosynthetic parameter ( $V_{c,max}$ ,  $J_{max}$ ,  $l$ ,  $g_s$ ,  $T$  and  $iWUE$ ) between species at the beginning of the experiment (T0) except in  $A_{sat}$  ( $P = 0.908$ ; Fig. 4.2.1a y SM 2.1a) where non-significant differences were found between species. A lower value of  $V_{c,max}$  and a higher of  $J_{max}$  were found in *A. donax* L. whereas *P. virgatum* L. showed lower values of  $l$ ,  $g_s$  and  $T$ . Therefore, a higher  $iWUE$  was observed in *P. virgatum* L. Significant differences were found also in the majority of the fluorescence parameters ( $F_v/F_m$ ,  $F_v'/F_m'$ ,  $\Phi_{PSII}$ , NPQ) between species at T0 except in  $q_p$  ( $P = 0.297$ ; SM 2.1b). The highest values of  $F_v/F_m$ ,  $F_v'/F_m'$  and  $\Phi_{PSII}$  were observed in *A. donax* L. whereas the highest value of NPQ was observed in *P. virgatum* L.

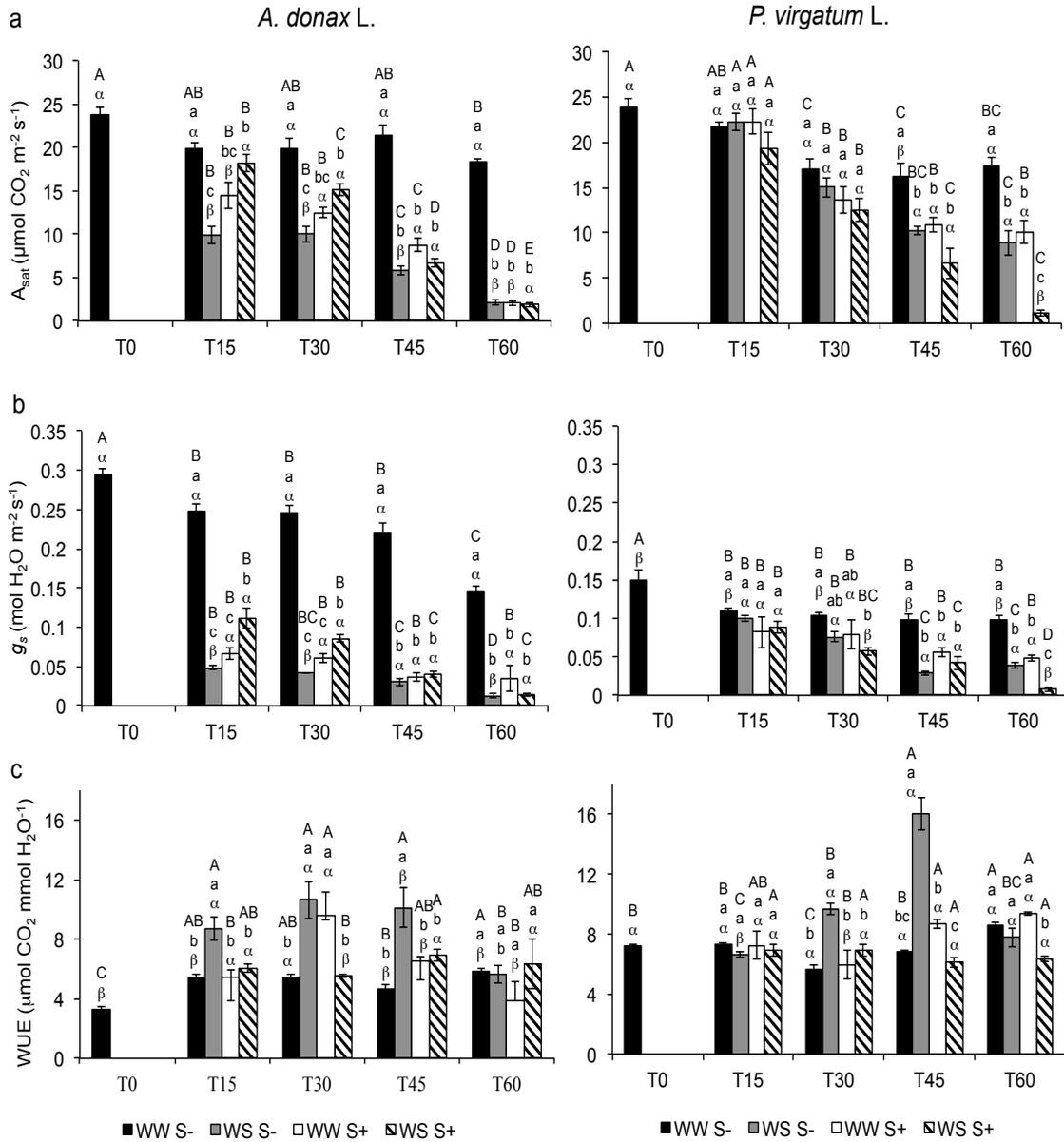
*A. donax* L. showed a significant decrease in  $A_{sat}$  at T15, particularly in WS S- where it decreased by 50% with respect to the control at the same time, following by the salinity treatment (WW S+) and both stresses treatment (WS S+) with decreases of 27 and 8%, respectively. Similar values of  $A_{sat}$  in the WS S- ( $9.9 \pm 0.9$ ) were found in T30 whereas salinity and both stresses values of  $A_{sat}$  decreased until 37% and 24% compared to the control at the same time, reaching values of  $12.4 \pm 0.6$  and  $15.1 \pm 0.6$ , respectively. At T45, the decrease of  $A_{sat}$  remained until T60, when non-significant differences were found between treatments that reached values of  $2.15 \pm 0.3$ ,  $2.0 \pm 0.2$  and  $1.9 \pm 0.3$  for WS S-, WW S+ and WS S+, respectively. In general, a decrease in  $A_{sat}$  of approximately 91% was observed at T60 in *A. donax* L. for every treatment with respect to the control at T0.

Nevertheless, *P. virgatum* L. did not show significant differences between treatments at T15 or even at T30, although a decrease in  $A_{sat}$  was observed in every treatment, particularly in the WS S+ ( $12.5 \pm 1.3$ ), which showed a decrease of 27% at T30 relative to the control ( $17.1 \pm 0.6$ ; Fig. 4.2.1a). At T45, a decrease in  $A_{sat}$  was observed and significant differences were found in all treatments in comparison to the control ( $16.2 \pm 1.5$ ), but not

between the stress treatments, which had values of  $10.2 \pm 0.4$ ,  $10.9 \pm 0.8$  and  $6.6 \pm 1.6$  for WS S-, WW S+ and WS S+, respectively. The lowest values of  $A_{\text{sat}}$  in *P. virgatum* L. were found in WS S+ at T60 ( $1.1 \pm 0.3$ ), representing a decrease of 95% in the  $A_{\text{sat}}$  observed at T0, whereas WS S- and WW S+ decreased 63% and 58%, respectively.

In relation to  $g_s$ , significant differences were found in the control treatment between species during the experiment.  $g_s$  values of *P. virgatum* L. were 55% lower than *A. donax* L. ones from T0 to T45, although the difference was reduced to 33% at T60 (Fig. 4.2.1b). For values of  $g_s$  between T0 and T60, *A. donax* L. showed decreases of 88%, 96% and 95% in WS S-, WW S+ and WS S+, respectively. However, *P. virgatum* L. decreased 73%, 67% and 95% for the same treatments. Moreover, a high correlation between  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  was found for both species in each treatment (SM 2.2).

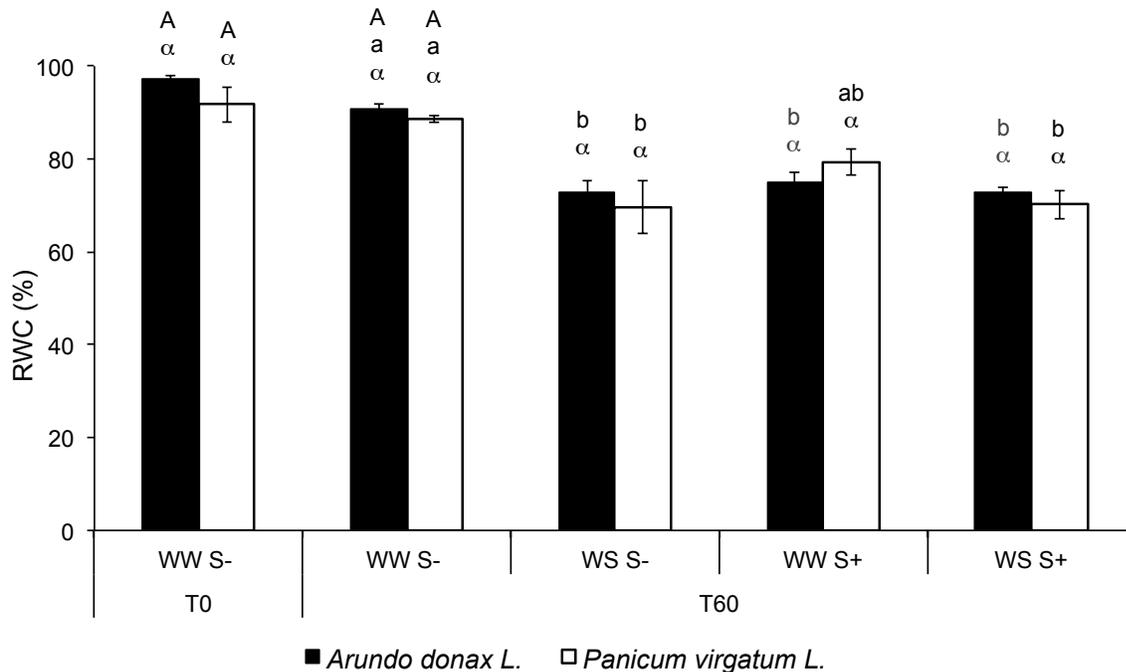
In relation to  $\psi\text{WUE}$ , significant differences were found in the control treatment between species ( $P = 0.000$ ) at T0 where *A. donax* L. showed lower  $\psi\text{WUE}$  than *P. virgatum* L. ( $3.3 \pm 0.2$  and  $7.2 \pm 0.2$ , respectively). An increase in WW S- was observed in *A. donax* L., while *P. virgatum* L. showed similar values during most of the experiment (Fig. 4.2.1c). The highest  $\psi\text{WUE}$  in *A. donax* L. was found in WS S- until T45, whereas similar values were found in all treatments at T60. *P. virgatum* L. showed similar values between treatments at T15 followed by an increase of WUE in WS S- at T30 and T45. However, the same values were observed at T60 in all treatments (Fig. 4.2.1c). In general, *P. virgatum* L. showed greater values of WUE than *A. donax* L. for each treatment at each time.



**Fig. 4.2.1.-** Representation of  $A_{sat}$  (a),  $g_s$  (b) and WUE (c) values of *A. donax* L. and *P. Virgatum* L. during the Exp. IIa (T0, T15, T30, T45, T60) for each treatment: i) well-watered without salinity (WW S-); ii) low watered without salinity (WS S-); iii) well-watered with salinity (WW S+) and iv) low watered with salinity (WS S+). Values are the mean of four replicates and standard errors (SE) are shown. Data were analysed with an ANOVA Tukey analysis. Different capital letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ) between time (T0-T60) for the same species and treatment, different small letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments for the same species and time and different Greek letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ) between species for the same treatment and time.

#### 4.2.1.2.- Relative water content (RWC)

A slight decrease in relative water content (RWC) occurred between T0 (97.2 ±0.8 and 91.7 ±3.7 for *A. donax* L. and *P. virgatum* L., respectively) and T60 (90.7 ±1.0 and 88.5 ±0.7) in the WW S- treatment, although no significant differences were found over time or between species (Fig. 4.2.2). *A. donax* L. RWC decreased by approximately 18% in all treatments relative to the control treatment at T60, and no significant differences were found between treatments. Otherwise, *P. virgatum* L. showed a decrease in RWC by 21% with respect to the control at T60 for WS S- (69.7 ±5.7) and WS S+ (70.1 ±3.0), although WW S+ decreased by only 10% (79.4 ±2.8). No significant differences were found between species for any treatment at any time.



**Fig. 4.2.2.-** Changes in relative water content (RWC, %) between the beginning (T0) and the end of the experiment (T60) for both species and treatments (WW S-, WS S-, WW S+ and WS S+). Data are the means of three replicates and the standard errors (SE) are shown. Data were analysed with an ANOVA Tukey analysis. Different capital letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ) between time (T0 – T60) for the same species in the control treatment (WW S-), different small letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments for a same species at T60 and different Greek letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ) between species for same treatment.

#### 4.2.1.3.- Chlorophyll content

Similar chlorophyll content values (SPAD units) were observed in *A. donax* L. between T0 and T60 in WW S-, however, a slight increase in chlorophyll content was noticed in *P. virgatum* L., from  $33.9 \pm 0.6$  to  $38.5 \pm 0.7$  (SM 2.3). The highest values of chlorophyll content in *A. donax* L. at T60 were found in those treatments where WS was not included (WW S- and WW S+) with values of  $49.2 \pm 0.4$  and  $47.5 \pm 0.9$  respectively, followed by WS S+ ( $44.4 \pm 0.4$ ) and WS S- ( $38.1 \pm 0.5$ ). No significant differences were found in *P. virgatum* L. between treatments at T60 ( $P = 0.084$ ). *A. donax* L. had higher values of chlorophyll content than *P. virgatum* L. in WW S- and WW S+, with a difference of 22% and 19%, whereas no significant differences were found in treatments where WS was included (WS S- and WS S+).

#### 4.2.1.4.- Biomass parameters

No significant differences were found in *H* (Table 4.2.1) in *A. donax* L. between treatments, even though an increase of 22% in WS S- and a decrease of 24% in WS S+ were recorded. Nevertheless, *P. virgatum* L. showed a decrease in every treatment relative to the control, with the most substantial decrease (33%) seen in WS S+.

A decrease in the NL was observed in every stress treatment and in both species, being more noticeable in treatments related to WS. *A. donax* L. showed a decrease of 76% in WS S-, and NL decreased in *P. virgatum* L. by 78% under WS S+.

*A. donax* L. LA (Table 4.2.1) decreased considerably (81%) in WS S- followed by WS S+ (66%) and WW S+ (48%) with respect to WW S-. *P. virgatum* L. was more affected by WS treatments, decreasing by 86% and by 91% in WS S- and WS S+ treatments, respectively, whereas WW S+ had a decrease of only 64% compared to the control. No significant differences were found between species in any treatment except in WW S- where *P. virgatum* L. had a greater LA than *A. donax* L.

GLP decreased in both species relative to the control as a consequence of stress, and was more pronounced in *A. donax* L. in which the greatest decrease occurred under WS S-

(67%). In contrast the greatest decrease in *P. virgatum* L. was only of 31% in the same treatment (Table 4.2.1). However, leaf curling was noticed in *P. virgatum* L. leaves as a consequence of water scarcity.

TDW also decreased in both species compared to the control (Table 4.2.1), being more evident in treatments where WS was included: *A. donax* L. decreased 51% in both WS S- and WS S+ and *P. virgatum* L. decreased 68% and 70% in WS S- and WS S+, respectively. A decrease by 16% and 46% was observed in WW S+ in *A. donax* L. and *P. virgatum* L., respectively. However, no significant differences between species were found in any stress treatment.

The highest value of the shoot/root index (S/R; Table 4.2.1) was found in WW S+ in *A. donax* L., which was even higher than the control. The lowest value for the same species was found in WS S- with a decrease by 35% in comparison to the control, followed by WS S+ (13%). On the other hand, *P. virgatum* L. decreased to a similar degree for WS S- and WS S+ (43% and 46%, respectively) while WW S+ remained almost unchanged compared to the control.

LMA increased under stress treatments in both species (Table 4.2.1), with a remarkable increase in *P. virgatum* L. under WS S+ (163%). SLA decreased in all treatments with respect to the control. SLA decreased in *A. donax* L. by 33% under WS S- and by 51% *P. virgatum* L. under WS S+. No significant differences were found in these two parameters between species in any of the treatments except for the both stresses treatment (WS S+).



## 4.2.2.- Experiment IIb: Temperature and continuous dark stress

### 4.2.2.1.- Gas exchange and fluorescence parameters

A different response to stress was found in both species during the experiment.  $A_{\text{sat}}$  was less affected by the cold treatment (CD) than by the ambient temperature treatment (AD). The decrease in  $A_{\text{sat}}$  in the AD treatment was 49% and 50% at 3d in *A. donax* L. and *P. virgatum* L. respectively, increasing over time (Table 4.2.2a,b). Declines of approximately 30% under the CD at 3d was shown in both species and remained throughout the experiment except for *A. donax* L., which decreased by another 14% from 6d (Table 4.2.2 A). In relation to recovery ( $R$ ), an increase in  $A_{\text{sat}}$  was observed in both treatments (except for *A. donax* L. in the CD treatment at 3d) and some complete recovery ( $R^*$ ) was found in the CD treatment, especially in *P. virgatum* L. (for 3 and 9d;  $P < 0.05$ ; Table 4.2.2a,b).

There was less effect of cold temperature than ambient on  $V_{\text{c,max}}$ . Decreases of 65% and 43% were observed in *A. donax* L. after 3d in AD and CD respectively, with a constant pattern over time (Table 4.2.2a). Increases in  $V_{\text{c,max}}$  were observed under AD after recovery. However, recovery was not observed at 6d and 9d. Significant decreases were noticed in *P. virgatum* L. for AD and CD at 3d (75% and 66%, respectively).  $V_{\text{c,max}}$  values decreased almost 94% at 9d in AD relative to the control, although in CD the  $V_{\text{c,max}}$  value was equal to the control value ( $P < 0.05$ ). Recovery was observed at 3d in CD conditions as well as in all AD conditions (Table 4.2.2a,b).

$J_{\text{max}}$  was the parameter that showed the most differences between the two species. Decreases of 56% and 61% were observed in *A. donax* L. after 3d in AD and CD, respectively. An additional 15% decrease was observed in AD at 6d, whereas value of  $J_{\text{max}}$  remained constant in CD ( $P < 0.05$ ). However, after 9d a ubiquitous response was found in both treatments (90% reduction). Despite these differences, both treatments had complete recovery in all experimental conditions (Table 4.2.2a). On the other hand, a different response was shown by *P. virgatum* L. due to a greater reduction in CD than in AD (81% and 53%, respectively) after 3d. The  $J_{\text{max}}$  value increased in AD (110%) but remained constant in CD conditions after 6d (Table 4.2.2b). A different situation was



In relation to stomatal limitation ( $l$ ), more noticeable differences were found in *A. donax* L. in CD than in AD conditions (Table 4.2.2a,b). An increase in  $l$  was observed at 3d (39%) and 9d (68%) in the AD treatment, but at 6d  $l$  remained similar to the control. Moreover,  $l$  increased more than double in CD after 3d, decreasing again after 6 and 9 d compared to the control. A progressive increase was observed in *P. virgatum* L. in AD conditions at 3d and 6d followed by a decrease at 9d to a lower value than the control. A similar pattern was observed in CD conditions where an increase to  $24.4 \pm 1.4$  at 6d was seen followed by a decrease to control levels (Table 4.2.2b). Recovery was complete in all conditions in AD but in CD it was not observed under any condition.

$F_v/F_m$  decreased in *A. donax* L. in both treatments although no significant differences were found in the CD treatment until 6d (Table 4.2.3a). A complete recovery of  $F_v/F_m$  was observed at 3d (AD and CD conditions) and at 6d (only in CD conditions). The most significant decrease in  $F_v/F_m$  was found in *P. virgatum* L. under CD conditions (Table 4.2.3b), where decreases of 7% at 3d and 16% at 6d were observed, whereas  $F_v/F_m$  decreased by only 3% and 5%, respectively, under AD conditions compared to the control. However, a complete recovery was found in all conditions in the CD treatment while at 6d under the AD treatment did not show a complete recovery.

$F_v'/F_m'$  was more affected by AD than by CD in both species. An initial decrease of 35% and 15% at 3d in *A. donax* L. in AD and CD conditions was observed, increasing by 12% and 13% more at 6d in each treatment respectively and remained constant after that time (Table 4.2.3a). Recovery was observed in all conditions except for 9d under AD. A similar decrease of 20-23% was found in AD and CD conditions at 3d in *P. virgatum* L. However, a greater decrease was observed at 6d (51%) under AD conditions while a slight recovery was seen at 9d (Table 4.2.3b). Recovery was observed in all experimental conditions although it was only at 3d (under AD and CD) and 9d under CD conditions where recovery was completed.

The decrease in  $\Phi_{PSII}$  became more pronounced over time until 6d, after which there was a stabilization or slight recovery by 9d in both treatments. In contrast to *A. donax* L., which



In relation to  $q_p$ , a greater decrease was observed in CD than in AD conditions in *A. donax* L., reaching values of  $0.37 \pm 0.04$  at 9d in comparison to the AD value of only  $0.56 \pm 0.01$ . No significant recovery was found under any CD conditions, while a complete recovery was found at 3d in AD. Moreover, *P. virgatum* L. showed a greater decrease in CD (38%) than in AD (12%) at 3d but at 6d a similar decrease was observed in both conditions (51% and 59%, respectively). A slight recovery was found at 9d in both treatments, being more substantial in CD conditions (an almost 20% R). Recovery was observed under all conditions while only a complete recovery was observed at 3d (Table 4.2.3b).

#### **4.2.2.2.- O<sub>2</sub> consumption, CO<sub>2</sub> production and the respiratory quotient (RQ)**

In relation to mitochondrial respiration, a more notable effect was observed in AD than in CD in both species (SM 2.4). A decrease by 32% and 33% in O<sub>2</sub> consumption in AD conditions was observed at 3d in *A. donax* L. and *P. virgatum* L., respectively, which increased to 72% and 66% at 6d and 77% and 73% at 9d, respectively (Table 4.2.4; SM 2.4). Nevertheless, the decrease in O<sub>2</sub> consumption in CD conditions was significantly lower, with a decrease of 53% in *A. donax* L. and only 11% in *P. virgatum* L. at 9d (Table 4.2.4; SM 2.4). Recovery was only observed in *A. donax* L. at 3d in AD ( $0.554 \pm 0.083$ ) and at 3d and 6d in CD ( $0.586 \pm 0.050$  and  $0.533 \pm 0.002$ , respectively) compared to the control ( $0.586 \pm 0.050$ ) and in *P. virgatum* L. at 9d in AD ( $0.514 \pm 0.047$ ) compared to the control ( $0.601 \pm 0.056$ ;  $P < 0.05$ ).

CO<sub>2</sub> production after 9d decreased in relation to the control in both species, and it was more marked in the AD treatment than in CD (Table 4.2.4). *A. donax* L. decreased CO<sub>2</sub> production by 90% in the AD treatment, but *P. virgatum* L. decreased almost 81%. Nevertheless, the decreases under CD conditions were 74% and 33% in both species, respectively.

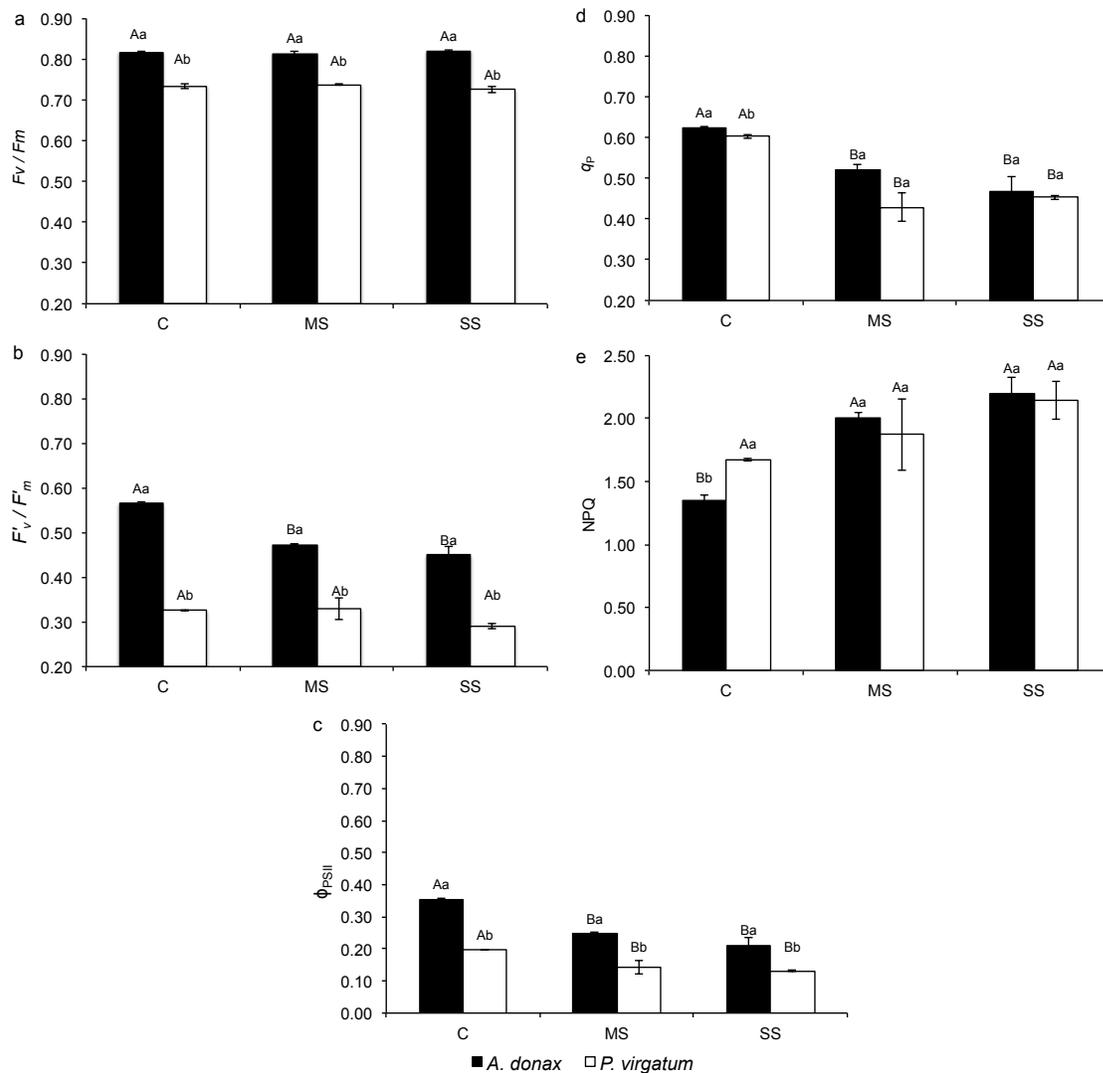
RQ was calculated as the ratio between the two parameters above (Table 4.2.4). Therefore, the greater the difference between O<sub>2</sub> consumption and CO<sub>2</sub> production the more distant RQ was from one. A similar decrease was observed for both treatments in



and *P. virgatum* L., respectively). Similar results were observed in other parameters like  $I$  (although a negative correlation was observed),  $J_{max}$ ,  $T$  and  $iWUE$ . Significant differences were found between treatments at the end of the experiment (Tf; Fig. 4.3.1).

Similar to the photosynthetic parameters, significant differences were found in fluorescence parameters (i.e.  $F_v/F_m$ ,  $F'_v/F'_m$  and  $\phi_{PSII}$ ), between species at the beginning of the experiment (Ti), being higher in *A. donax* L. than in *P. virgatum* L. (SM 3.1). However, other parameters as  $q_p$  and NPQ had similar values ( $P > 0.05$ ; SM 3.1). Decreases in fluorescence parameters were observed between C-SS treatments at Tf in both species.  $F'_v/F'_m$  decreased 20% and 11% in *A. donax* L. and *P. virgatum* L., respectively, whereas  $\phi_{PSII}$  decreased 40% and 33%. Similar decreases were observed in  $q_p$  in both species (25%), while  $F_v/F_m$  did not change and NPQ increases over the WS (63% and 28% respectively for both species; Fig. 4.3.2).

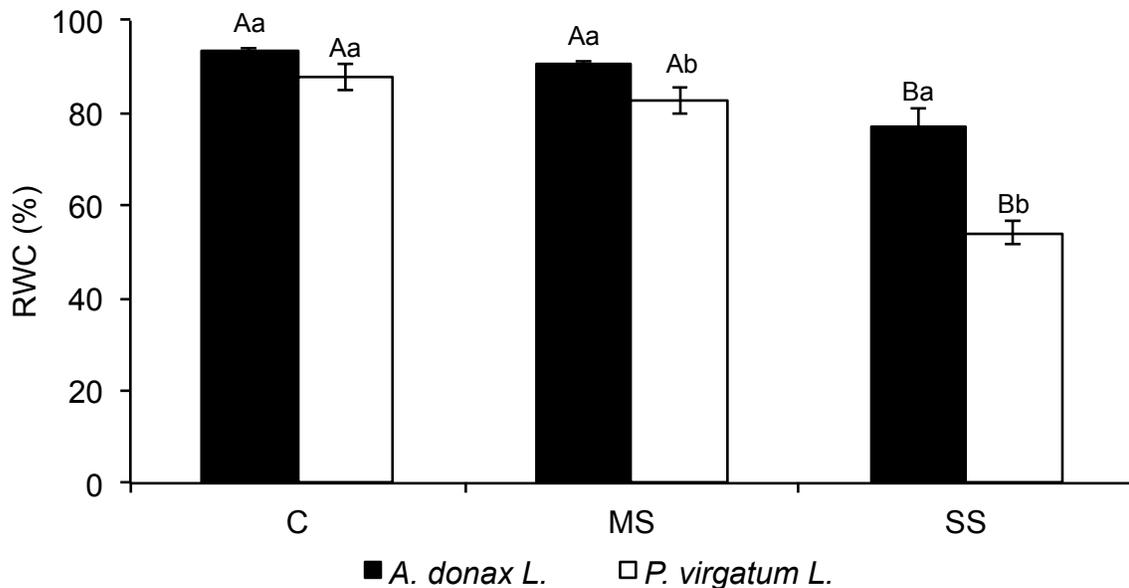




**Fig. 4.3.2.-** Fluorescence parameters ( $F_v/F_m$ , maximal photochemical efficiency in the dark –adapted stage (a);  $F'_v/F'_m$ , maximal photochemical efficiency in light (b);  $\phi_{PSII}$ , relative quantum yield of Photosystem II electron transport (c);  $q_p$ , photochemical quenching (d); NPQ, non-photochemical quenching (e)) in both species (*A. donax* L. and *P. virgatum* L.) for each treatment: i) Control (C, 100% FC), ii) Mild Stress (MS, 50% FC) and iii) Severe Stress (SS, 25% FC) at the end of the experiment (Tf). Data are the means of three replicates and the standard error is shown. Data were analysed with an ANOVA Tukey analysis. Different capital letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments for the same species. Different small letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between species for the same treatment. Fluorescence parameters at the beginning of the experiment (Ti) can be found in Table SM 3.1

#### 4.3.2.- RWC

No significant differences were found between C ( $93.4 \pm 0.9$  and  $87.9 \pm 2.9$ ) and MS ( $90.6 \pm 0.9$  and  $82.7 \pm 3.1$ ) in *A. donax* L. and *P. virgatum* L., respectively. As expected, decreases in RWC were larger in SS treatment ( $76.8 \pm 4.1$  and  $54.1 \pm 2.4$ ), where significant differences were found respect C and MS. *A. donax* L. showed lower decreases in RWC in stress treatments respect C (3% and 18% in MS and SS, respectively) than *P. virgatum* L., that decreased 6% and 38% in MS and SS respect C (Fig. 4.3.3).



**Fig. 4.3.3.-** Changes in Relative Water Content (RWC, %) in both species (*A. donax* L. and *P. virgatum* L.) for each treatment: i) Control (C, 100% FC), ii) Mild Stress (MS, 50% FC) and iii) Severe Stress (SS, 25% FC) at the end of the experiment (Tf). Data are the means of three replicates and SE is shown. Data were analysed with an ANOVA Tukey analysis. Different capital letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments for the same species. Different small letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between species for the same treatment

#### 4.3.3.- Biomass parameters

In relation to both species, significant differences were found in most of the biomass parameters in each treatment and time (Table 4.3.1). An increase in height ( $H$ ) was observed in all treatments in *A. donax* L. (C: 50%; MS: 16%; SS: 13%) with respect to  $T_i$ , although only significant differences between  $T_i$  and  $T_f$  are observed in C ( $P < 0.001$ ). Nevertheless, significant differences were found in all treatments in *P. virgatum* L. due to

remarkable increases in height (C: 183%; MS: 123%; SS: 50%) between Ti and Tf (Table 4.3.1). Decreases in H were observed in both species as WS increased at Tf with respect to C, being more important in *P. virgatum* L. (MS: 7% and 19%; SS: 18% and 34% in *A. donax* L. and *P. virgatum* L., respectively).

An increase in number of stems (NS) was also observed in all treatments in both species between Ti and Tf, although only significant differences were found in C in *A. donax* L., with an increase of 60%. Significant differences were found in NS between treatments, even at Ti in both species. Similar decreases in NS were also noticed in both species along treatments at Tf with respect to C (MS: 21% and 28%; SS: 53% and 45% in *A. donax* L. and *P. virgatum* L., respectively; Table 4.3.1).

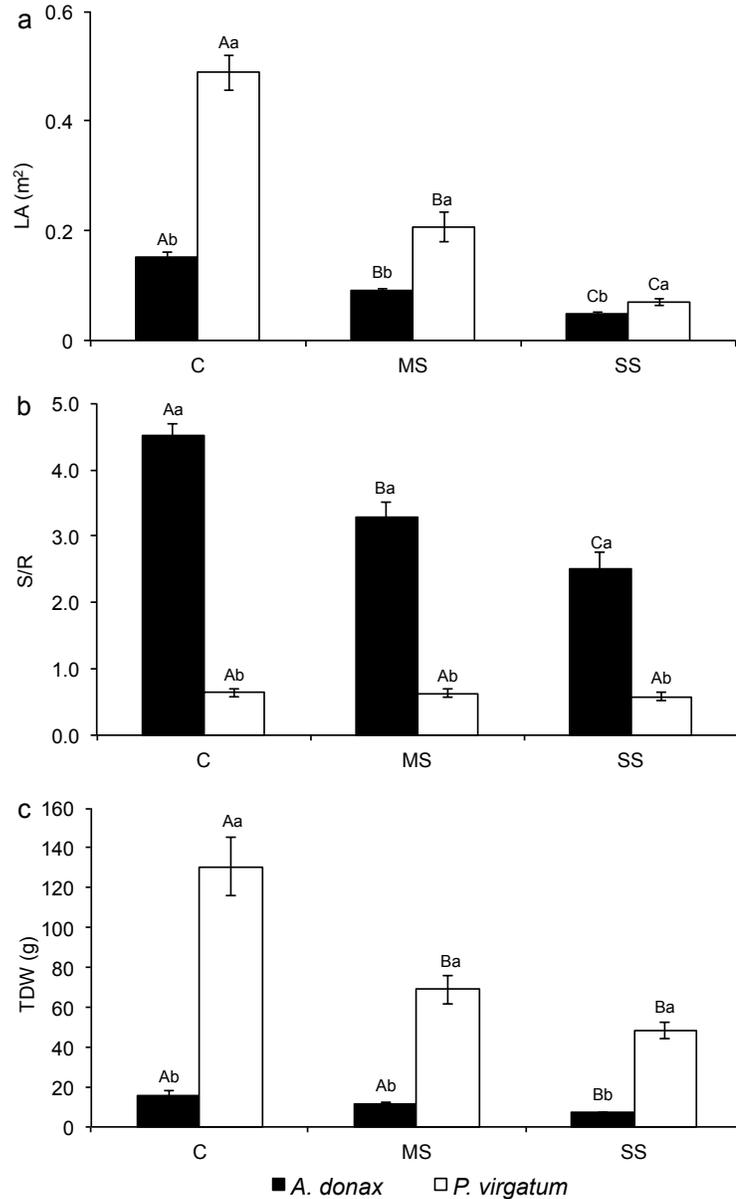
The increase of number of green leaves (NGL) between Ti and Tf was higher in *A. donax* L. (C: 148%; MS: 62%; SS: 14%), where significant differences were found in C and MS ( $P = 0.000$  and  $0.006$ , respectively) than in *P. virgatum* L. (C: 71%; MS: 7%), where significant differences were only found in C treatment ( $P = 0.012$ ) and an important decrease was observed in SS treatment (43%;  $P = 0.000$ ). The decrease in NGL in relation to C was very important in both species at Tf (MS: 29% and 49%; SS: 65% and 74% in *A. donax* L. and *P. virgatum* L., respectively).

An important decrease in Leaf Area (LA; Fig. 4.3.4a) and Stem Area (SA; SM 3.2) was noticed in both species at Tf with increasing soil water depletion. LA decreased 40% (between C-MS) and 69% (between C-SS) in *A. donax* L. and 58% (between C-MS) and 86% (between C-SS) in *P. virgatum* L. . At the same time, SA decreased 32% (between C-MS) and 65% (between C-SS) in *A. donax* L. and 58% (between C-MS) and 75% (between C-SS) in *P. virgatum* L. . Although decreases in LA and SA as a consequence of WS were greater in *P. virgatum* L. than in *A. donax* L., the first species had greater values of LA and SA than *A. donax* L. in each treatment (Fig. 4.3.4a; SM 3.2).



species (57 and 63% in *A. donax* L. and *P. virgatum* L., respectively) although TDW values in *P. virgatum* L. were significantly higher (C:  $130.7 \pm 15.0$ ; MS:  $69.0 \pm 7.3$ ; SS:  $48.3 \pm 3.9$ ) than in *A. donax* L. (C:  $16.1 \pm 2.1$ ; MS:  $11.9 \pm 0.5$ ; SS:  $7.0 \pm 0.7$ ; Fig. 4.3.4c).

Leaf Mass Area (LMA,  $\text{Kg m}^{-2}$ ) was the only biomass parameter that increased with increasing WS levels (SM 3.2). LMA values in C treatment were similar in both species ( $41.2 \pm 2.4$  and  $47.8 \pm 1.8$  in *A. donax* L. and *P. virgatum* L., respectively), and remained constant in *A. donax* L. in MS and SS ( $P = 0.059$ ), whereas an important increase was observed in *P. virgatum* L. (33% in MS in relation with C and 90% in SS in relation with MS), reaching a value of  $121.2 \pm 8.9$  in SS. Specific Leaf Area (SLA;  $\text{m}^2 \text{Kg}^{-1}$ ) had a similar pattern as LMA parameter but reversed. SLA values in C treatment were similar in both species ( $24.8 \pm 1.2$  and  $21.1 \pm 0.7$  in *A. donax* L. and *P. virgatum* L., respectively), and a slightly decrease was observed in *A. donax* L. between C-MS (15%) keeping constant in SS ( $21.1 \pm 0.9$ ; SM 3.2). On the other hand, an important decrease was observed in *P. virgatum* L. (19% in MS in relation with C and 50% in SS in relation with MS), reaching a value of  $8.6 \pm 0.6$  in SS. Significant differences in Leaf Area Ratio (LAR;  $\text{m}^2 \text{Kg}^{-1}$ ) were found between C-MS in *A. donax* L. whereas in *P. virgatum* L. were only found between MS and SS. A decrease was observed in LAR in SS in relation with C in both species, being higher in *P. virgatum* L. (29 and 62% in *A. donax* L. and *P. virgatum* L., respectively). On the other hand, significant differences in Leaf Weight Ratio (LWR;  $\text{Kg Kg}^{-1}$ ) were only found between C-SS in *A. donax* L. whereas no significant differences were found between treatments in *P. virgatum* L. . Higher values in LAR and LWR were noticed in *A. donax* L. than in *P. virgatum* L. (SM 3.2).



**Fig. 4.3.4.-** Effect of stress in biomass parameters (LA, Leaf Area (a); S/R, Shoot/Root (b); TDW, Total Dry Weight (g, c) in both species (*A. donax* L. and *P. virgatum* L.) for each treatment: i) Control (C, 100% FC), ii) Mild Stress (MS, 50% FC) and iii) Severe Stress (SS, 25% FC) at the end of the experiment (Tf). Data are the means of nine replicates and the standard error is shown. Data were analysed with an ANOVA Tukey analysis. Different capital letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments for the same specie and time. Different small letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between species for the same time and treatment

#### 4.3.4.- $\delta^{13}\text{C}$ of total organic matter ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$ ) and total C content (C<sub>t</sub>)

$\delta^{13}\text{C}$  values of total organic matter ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$ , ‰) were -29.4‰, -30.6‰, -29.1‰ and -28.8‰ for each *A. donax* L. organ (leaf, stem, root and rhizome, respectively; Fig. 4.3.5a) before labelling (T0) in C. A  $^{13}\text{C}$ -enrichment was observed in each organ with increasing soil water depletion, and significant differences between C-SS treatments were found in each organ, except in leaves ( $P = 0.184$ ). On the other hand,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$  values in *P. virgatum* L. were -13.8‰, -14.0‰, -13.8‰ and -13.9‰ for each organ (leaf, stem, root and rhizome, respectively; Fig. 4.3.5b) at T0 in C. Moreover, no significant differences between treatments were found in each organ. In general, roots were the organs more  $^{13}\text{C}$  enriched in each treatment in *A. donax* L. whereas no significant differences between organs were found in *P. virgatum* L. at T0.

$^{13}\text{C}$  enrichment was observed after labelling (T1) in both species (Fig. 4.3.5).  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$  was +5.7‰, +27.2‰, +0.6‰, +14.8‰ and +7.9‰, +22.7‰, -1.7‰ and +6.0‰ in leaves, stems, roots and rhizomes of *A. donax* L. and *P. virgatum* L. in C, respectively. In general, a  $^{13}\text{C}$  enrichment was observed in both species and in each organ with increasing WS level, except in stems and roots in *A. donax* L., where the highest increase was noticed in MS treatment ( $P = 0.034$  and  $0.004$ , respectively). Stem was the organ with highest  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$  at T1 in both species.

$\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$  values in C at T2 were depleted in relation with T1 values reaching values of -11.7‰, -9.4‰, -15.3‰ and -5.5‰ (Fig. 4.3.5a) and -0.4‰, +13.0‰, -6.6‰ and +3.9‰ (Fig. 4.3.5b) in leaves, stems, roots and rhizomes of *A. donax* L. and *P. virgatum* L., respectively. C was more  $^{13}\text{C}$  depleted than stress conditions (MS and SS) in each organ. In general, stem was the organ with highest  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$  values in each treatment, except in C and SS treatments in *A. donax* L., where no significant differences between organs were found ( $P = 0.264$  and  $0.410$ , respectively).



found between species: significant differences were found between treatments in *A. donax* L. leaves ( $P = 0.045$ ) whereas C content in stems remained constant ( $P = 0.082$ ). On the other hand, significant differences were found between treatments in *P. virgatum* L. stems ( $P = 0.014$ ) whereas C content in leaves remained constant ( $P = 0.860$ ). In general, a similar C content was found in both species, except in control conditions, where a lower amount of C was found in leaves and stems in *A. donax* L. ( $50.7 \pm 1.6$  and  $50.7 \pm 0.6$ , respectively) than in *P. virgatum* L. ( $54.3 \pm 0.6$  and  $53.1 \pm 0.5$ ; SM 3.3).

Leaves and stems were the organs with lower and higher  $C_c/N_c$  ratio respectively in both species. In general, a higher  $C_c/N_c$  ratio was found in *P. virgatum* L. than in *A. donax* L., mainly in this two organs (SM 3.3).

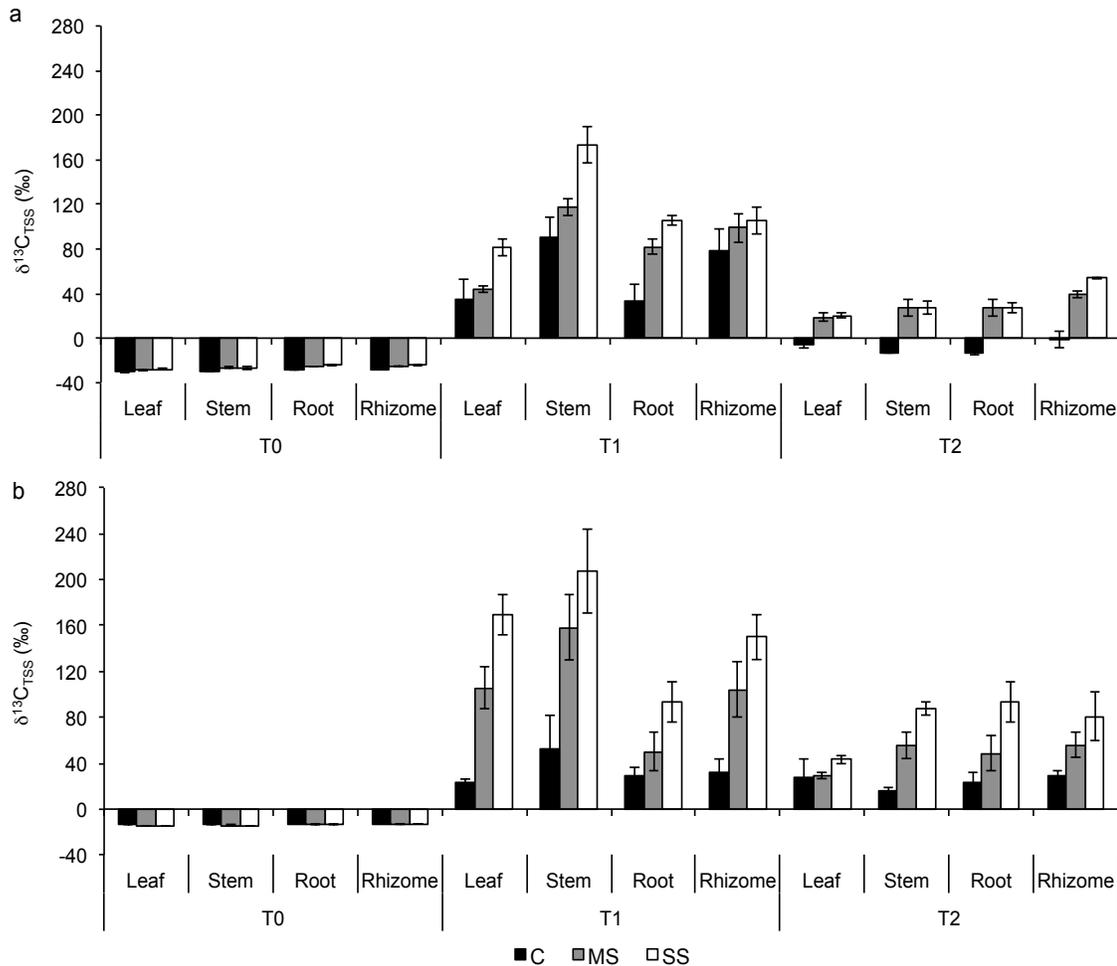
#### **4.3.5.- $\delta^{13}\text{C}$ of Total Soluble Sugars ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{TSS}}$ )**

$\delta^{13}\text{C}$  values of TSS ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{TSS}}$ , ‰) in C before labelling (T0) were -30.5‰, -29.7‰, -28.2‰ and -27.7‰ for each *A. donax* L. organs (leaf, stem, root and rhizome, respectively; Fig. 4.3.6a). A  $^{13}\text{C}$ -enrichment was observed in each organ with increasing soil water depletion.

Significant differences between C-SS treatments were found in each organ except in stems ( $P = 0.087$ ). On the other hand,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TSS}}$  values in *P. virgatum* L. were -13.8‰, -13.4‰, -12.7‰ and -12.6‰ for each organ (leaf, stem, root and rhizome, respectively; Fig. 4.3.6b) in C at T0. Moreover, only significant differences between C-SS treatments were found in leaves ( $P = 0.016$ ). In general, roots and rhizomes were the organs with lower  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TSS}}$  in each treatment in both species.

An enrichment in  $\delta^{13}\text{C}$  was observed in both species after labelling (T1).  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TSS}}$  values were +34.3‰, +90.6‰, +33.8‰, +77.9‰ and +23.0‰, +53.0‰, +29.4‰, +32.5‰ in leaves, stems, roots and rhizomes of *A. donax* L. and *P. virgatum* L. in C, respectively (Fig. 4.3.6a,b). A  $^{13}\text{C}$ -enrichment was also observed in both species and in each organ with increasing soil water depletion, although significant differences were only found in stems and roots in *A. donax* L. ( $P = 0.020$  and  $0.005$ , respectively). In relation to *P. virgatum* L.,

significant differences between treatments were found in each organ, except in roots ( $P = 0.057$ ). Stem was the organ with highest  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TSS}}$  at T1 in each organ and in both species. However, significant differences were only found in MS and SS treatments.



**Fig. 4.3.6.-** Water stress effects (Control (C, 100% FC), Mild stress (MS, 50% FC) and Severe Stress (SS, 25% FC) on  $\delta^{13}\text{C}$  values (‰) of sugars ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{TSS}}$ ) in leaves, stems, roots and rhizomes in both species (*A. donax* L. (a) and *P. virgatum* L. (b)) before labelling (T0), 1 day after labelling (T1) and 7 days after labelling (T2). Statistical analysis is presented in SM 3.4

A  $^{13}\text{C}$ -depletion between T1 and T2 was observed in both species in C, being greater in *A. donax* L. than in *P. virgatum* L. . No significant differences were found in any organ in *P. virgatum* L. . A depletion in  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TSS}}$  between T1 and T2 was also observed in both species in MS and SS conditions. These decreases were significant in each *A. donax* L.

organs and most of *P. virgatum* L. (except for roots and rhizomes in MS treatment and rhizomes in SS treatment).

#### **4.3.6.- $\delta^{13}\text{C}$ of dark-respired $\text{CO}_2$ determination ( $\delta^{13}\text{C}_R$ ) and $R_d$**

$\delta^{13}\text{C}$  values of the dark-respired  $\text{CO}_2$  ( $\delta^{13}\text{C}_R$ , ‰) were -21.5‰, -19.2‰, -20.7‰ and -22.5‰ for each *A. donax* L. organ (leaf, stem, root and rhizome, respectively) at T0 in C (Fig. 4.3.7a). A  $^{13}\text{C}$  enrichment was observed in each organ with increasing WS level. However, significant differences between C-SS treatments were only found in stems and roots ( $P = 0.041$  and  $0.029$ , respectively). On the other hand,  $\delta^{13}\text{C}_R$  values in *P. virgatum* L. were -12.8‰, -12.9‰, -13.3‰ and -13.1‰ for each organ (leaf, stem, root and rhizome, respectively; Fig. 4.3.7b) at T0 in C. Moreover, no significant differences between treatments were found in each organ. In general, leaves and rhizomes were more  $^{13}\text{C}$  depleted than the other organs in each treatment in *A. donax* L. whereas no significant differences between organs were found in *P. virgatum* L. at T0.

A  $^{13}\text{C}$  enrichment after labelling (T1) was observed in both species (Fig. 4.3.7).  $\delta^{13}\text{C}_R$  values were +36.2‰, +13.2‰, +34.5‰, +59.3‰ and -2.5‰, -3.1‰, +13.3‰, +26.9‰ in leaves, stems, roots and rhizomes of *A. donax* L. and *P. virgatum* L. in C, respectively. In general, a  $^{13}\text{C}$  enrichment trend was observed in both species and in each organ with increasing soil water depletion, except in *A. donax* L. leaves, although no significant differences were observed between treatments ( $P = 0.229$ ). Moreover, no significant differences were found also in *A. donax* L. roots and rhizomes ( $P = 0.630$  and  $0.082$ , respectively). However, significant differences were found in *A. donax* L. stems and in each *P. virgatum* L. organ. In general, *A. donax* L. rhizome was the most  $^{13}\text{C}$  enriched organ, whereas more similar values between organs were found in *P. virgatum* L. in each treatment.  $\delta^{13}\text{C}$  depletion was observed in C between T1 and T2 (Fig. 4.3.7). The depleted  $\delta^{13}\text{C}_R$  values were observed in C in relation to stress (MS and SS) in each organ except in *A. donax* L. leaves, where no significant differences were found ( $P = 0.132$ ) and in *P. virgatum* L. stems, where MS treatment was more  $^{13}\text{C}$  enriched than C and SS values. In general, rhizomes in



lowest  $R_d$  rates in *A. donax* L. . On the other hand, root and rhizome are the organs with the highest  $R_d$  rate in *P. virgatum* L. (SM 3.3).

#### **4.3.7.- $\delta^{15}\text{N}$ of total organic matter ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{TOM}}$ ) and total ( $\text{N}_c$ )**

In relation to  $\delta^{15}\text{N}_{\text{TOM}}$  a similar pattern as  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$  was observed. The  $\delta^{15}\text{N}_{\text{TOM}}$  values were +3.6‰, +6.4‰, +9.9‰ and +0.6‰ in *A. donax* L. and +3.0‰, +3.6‰, +1.5‰ and +0.6‰ in *P. virgatum* L. for each organ (leaf, stem, root and rhizome, respectively; Fig. 4.3.8a,b) at T0 in C. No significant differences between treatments were observed in each organ in both species, except in *A. donax* L. roots, where a  $^{15}\text{N}$  depletion was noticed in relation to C ( $P = 0.044$ ). In general, a  $^{15}\text{N}$  enrichment was observed in stems in relation to the other organs in both species, especially rhizomes, which presented the lowest  $\delta^{15}\text{N}_{\text{TOM}}$  values in each treatment.

Large  $^{15}\text{N}$  enrichment was observed after labelling (T1) in both species, especially in *A. donax* L. (Fig. 4.3.8a).  $\delta^{15}\text{N}_{\text{TOM}}$  values were +790.4‰, +1447.9‰, +1187.1‰, +1274.0‰ and +428.0‰, +961.9‰, +652.0‰, +1254.4‰ in leaves, stems, roots and rhizomes of *A. donax* L. and *P. virgatum* L. in C, respectively (Fig. 4.3.8a,b). In general, a  $^{15}\text{N}$  depletion was observed in both species and in each organ with increasing soil water depletion, and significant differences were found between C-SS in each organ in both species. Moreover, leaves are the organs with lowest  $\delta^{15}\text{N}_{\text{TOM}}$  values in both species followed by roots in *P. virgatum* L. .



any treatment in both species. Moreover, no significant differences between T1 and T2 were noticed in most of the organs in both species in each treatment.

The highest N content ( $N_c$ , %  $\text{mg}^{-1}$ ) between organs was noticed in leaves in both species, being higher in *A. donax* L. leaves than in *P. virgatum* L. in each treatment ( $P = 0.000$ ). Decreases in  $N_c$  were found in *A. donax* L. leaves over the stress increases (10% in *MS* and 22% in *SS* in relation to *C*) whereas a different pattern was observed in *P. virgatum* L. leaves. No significant differences were found between treatments in stems and roots of *A. donax* L. and in roots in *P. virgatum* L. . However, an increase in  $N_c$  was noticed in stems (20% in *MS* and 91% in *SS* in relation to *C*) and rhizomes (15% in *MS* and 32% in *SS* in relation to *C*) of *P. virgatum* L. when the stress increased (SM 3.3).

# **RESUMEN DE MATERIALES Y MÉTODOS Y RESULTADOS**



En este apartado trataremos de resumir brevemente y de forma conjunta la secciones redactadas en inglés, es decir, materiales y métodos (punto 3) y resultados (punto 4).

La Tesis se basa en el estudio de las respuestas fisiológicas de dos especies de gramíneas perennes (*A. donax* L. (C<sub>3</sub>) y *P. Virgatum* L.(C<sub>4</sub>)) a diferentes estreses. Para ello se realizaron diversos experimentos resumidos en la Tabla 3.1.1.

Cinco clones de *A. donax* L. ("Fondachello", "Tortorici", "Cefalú", "Licata" y "Agrigento") fueron recolectados de los Campos Experimentales de la Universidad de Catania (Italia, UNICT). Los clones "Martinensis" y "Granadensis" fueron recolectados en diferentes áreas de España y el clon "Piccoplant" fue proporcionado por la compañía Piccoplant (Oldenburg, Alemania). Las plantas de *P. Virgatum* L. "Alamo" fueron obtenidas a partir de semillas germinadas a una temperatura de 22/18°C (día/noche) y 70% de humedad relativa.

### **Metodología utilizada en los experimentos:**

#### Medidas fisiológicas (Exp. I, II y III)

- Intercambio gaseoso y parámetros de fluorescencia: Se midió con un sistema de medición de fotosíntesis (Li6400, Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA) que lleva un fluorómetro incorporado. Las medidas se llevaron a cabo a 25°C y saturación de luz (1200  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de PPFD), un flujo de 500  $\text{mmol s}^{-1}$  y una [CO<sub>2</sub>] de 400ppm. Se midió la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> neta en condiciones saturantes de luz ( $A_{\text{sat}}$ ;  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), la conductancia estomática ( $g_s$ ;  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), la transpiración ( $T$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), la máxima velocidad de carboxilación de la Rubisco ( $V_{c, \text{max}}$ ;  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), la máxima tasa de transporte de electrones que contribuye a la regeneración de RuBP ( $J_{\text{max}}$ ;  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), la limitación estomática ( $l$ , %), el rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ), la eficiencia en la captura de la energía de excitación por los centros de reacción abiertos del PSII ( $F'_v/F'_m$ ), el rendimiento cuántico relativo del transporte de electrones en PSII ( $\phi_{\text{PSII}}$ ), el *quenching* fotoquímico ( $q_p$ ) y el *quenching* no fotoquímico (NPQ).

A su vez se calculó la eficiencia instantánea en el uso del agua ( $WUE$ ) como  $A_{sat}$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) /  $T$  ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

- Contenido relativo de agua (RWC, %): Se calculó como  $(FW-DW)/(TW-DW) * 100$ ; donde FW es el peso fresco, DW el peso seco (tras ser secado en un horno a  $60^\circ\text{C}$  hasta peso constante) y TW es el peso turgente (tras ser mantenido en agua destilada a  $4^\circ\text{C}$  durante 24h).
- Contenido de clorofilas: Se midió en la primera o segunda hoja totalmente expandida con un medidor Minolta SPAD 502 Meter.
- Consumo de  $\text{O}_2$ , producción de  $\text{CO}_2$  y cociente respiratorio (RQ): El consumo de  $\text{O}_2$  ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) se midió con un electrodo de oxígeno y la producción de  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) con un protocolo adaptado de Sinclair y col. (1945). El cociente respiratorio (RQ) se calculó como Producción de  $\text{CO}_2$  / Consumo de  $\text{O}_2$ .

#### Medidas de biomasa (Exp. I, II y III)

Fueron realizadas al finalizar los experimentos. Se determinó la altura (H; cm), el número de tallos (NS) y el número de hojas (NL) por planta, el área foliar verde (gLA;  $\text{m}^2$ ), el área de los tallos (SA;  $\text{m}^2$ ), el peso total seco (TDW; g), el porcentaje de hojas verdes, amarillas y secas, respectivamente (GLP, YLP y DLP; %), la relación parte aérea/parte subterránea (S/R;  $\text{g g}^{-1}$ ), el área foliar específica (SLA,  $\text{m}^2 \text{ Kg}^{-1}$ ), el área de masa foliar (LMA;  $\text{Kg m}^{-2}$ ), la relación peso foliar (LWR;  $\text{Kg Kg}^{-1}$ ), la relación área foliar (LAR;  $\text{m}^2 \text{ Kg}^{-1}$ ).

#### Índice de Susceptibilidad al Estrés (SSI; Exp. I)

Se calculó para los parámetros más importantes de ambos experimentos ( $A_{sat}$ ,  $g_s$ , GLP, TDW, S/R, SLA) usando la siguiente ecuación  $SSI = [(1 - (Y_s / Y_p))] / [(1 - (X_s / X_p))]$  (Fischer y Maurer, 1978), donde  $Y_s$ ,  $Y_p$ ,  $X_s$  y  $X_p$  representan los parámetros bajo estrés y no estrés para cada clon ( $Y_s$  y  $Y_p$ ) y bajo estrés y no estrés para la media de todos los clones ( $X_s$  y  $X_p$ ).

#### Marcaje isotópico con $^{13}\text{C}$ y $^{15}\text{N}$ (Exp. III)

Se realizó un doble marcaje isotópico en ambas especies en una cámara de ambiente controlado. Por un lado se marcó con  $^{13}\text{CO}_2$  comercial (99,9  $^{13}\text{C}$ ) inyectado mediante una



descenso de  $A_{\text{sat}}$  por el estrés hídrico (WS S-; 91%) mientras que Agrigento fue el clon menos afectado, con un descenso del 82%. En relación a la salinidad, el clon más afectado fue Granadensis (92%) mientras que Cefalú, Licata y Piccoplant solamente descendieron 70%, 78% y 81%, respectivamente. A su vez, Granadensis fue también el clon más afectado por el tratamiento de doble estrés (92%).

En relación al contenido relativo de agua en la hoja (RWC), se observó un descenso en los valores de todos los clones debido a los distintos estreses (Fig. 4.1.2). En general, este descenso fue mayor en los tratamientos donde existía WS. A su vez, se observó un descenso en el contenido de clorofila en todos los tratamientos al finalizar el experimento con respecto al inicio, siendo más marcado en los tratamientos de WS (SM 1.2).

En cuanto a la biomasa, parámetros como la altura ( $H$ ), el número y el diámetro de tallos (NS y SD, respectivamente) disminuyeron como consecuencia del estrés, principalmente del WS, al igual que el número de hojas (NL), el área foliar verde (gLA), el porcentaje de hojas verdes y secas (GLP y DLP, respectivamente) y el peso seco total (TDW; Table 4.1.1). En relación a gLA, Cefalú fue el clon con mayor disminución (93%) en el tratamiento WS S- mientras que los menos afectados fueron Granadensis (78%) y Agrigento (75%). Tortorici y Agrigento fueron los clones más afectados por la salinidad (WW S+) en cuanto a gLA, con disminuciones de 71% y 69% respectivamente, y Licata fue el más afectado por la combinación de estreses (WS S+), con una disminución del 89%. En general, la producción de biomasa (medida como TDW) sufrió una disminución importante en los tratamientos de WS (61% y 66% de disminución en WS S- y WS S+, respectivamente; Fig. 4.1.3). El índice S/R disminuyó principalmente en el tratamiento de WS (Table 4.1.2). La producción de la parte aérea ( $S$ ) se vio muy afectada por WS mientras que la parte subterránea ( $R$ ) se vio menos afectada. Se observó una importante influencia del WS en parámetros como LAR y LWR, ya que descendieron considerablemente bajo los tratamientos de WS S- (58 y 41%, respectivamente) y WS S+ (46 y 24%, respectivamente; Table 4.1.2).

Al clasificar los 8 clones en relación al Índice de Susceptibilidad al Estrés (SSI; Fig. 4.1.6) se observó como Agrigento fue el clon con mayor tolerancia al estrés hídrico (SSI=0,84),

seguido por Granadensis, Martinensis y Fondachello (0,88, 0,92 y 1,01, respectivamente). Por otro lado, Martinensis y Cefalú fueron los clones con mayor tolerancia al estrés salino (0,59 y 0,68, respectivamente). Martinensis a su vez fue el clon con mayor tolerancia a la combinación de ambos estreses (0,86) junto con Piccoplant y Tortorici (0,89 y 0,97, respectivamente).

Experimento Ib: Screening para distintos niveles de salinidad (UB y UNICT; Fig. 3.2.2) Se estudiaron 5 clones de *A. donax* L. en dos localizaciones: UNICT (estrés salino moderado): i) control (UNICT S0; 1mS cm<sup>-2</sup>) y ii) estrés moderado (UNICT S4; 4mS cm<sup>-2</sup>) y UB (estrés salino severo): i) control (UB S0; 1mS cm<sup>-2</sup>) y ii) estrés severo (UB S16; 16mS cm<sup>-2</sup>) durante dos meses.

Se observaron diferencias significativas en  $A_{sat}$  y  $g_s$  entre UNICT S0 y UNICT S4 en Tf en todos los clones, excepto en  $A_{sat}$  en Cefalú (Fig. 4.1.4a), y en todos los clones entre UB S0 y UB S16 (Fig. 4.1.4b). Fondachello y Cefalú fueron los clones con mayores valores de  $A_{sat}$  y  $g_s$  en los tratamientos de salinidad (UNICT S4 y UB S16). A niveles bajos de salinidad (UNICT S4) se observó un aumento en el contenido de clorofilas mientras que a altos niveles de salinidad (UB S16) el contenido de clorofilas disminuyó (SM 1.4a,b). En condiciones control, Licata fue uno de los clones con mayor contenido de clorofilas tanto en UNICT como en UB, mientras que Fondachello mostró alto contenido de clorofilas en ambas condiciones de estrés (UNICT S4 y UB S16).

En relación a la biomasa, no se observó una disminución en gLA (a excepción de Agrigento) ni en TDW (a excepción de Licata) a bajos niveles de salinidad (entre UNICT S0 y UNICT S4), pero si a altos niveles de salinidad (entre UB S0 y UB S16), siendo Tortorici el clon con mayor disminución de gLA (71%) y Fondachello el de menor disminución de gLA (47%). Fondachello fue el clon con mayor TDW en ambas localizaciones. Se observó una tendencia a la disminución en los valores de S/R y de SLA, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos control y de salinidad.

Fondachello (0,55 y 0,99) Cefalú (1,40 y 0,71) y Licata (1,44 y 0,99) fueron los clones con mayor tolerancia a la salinidad en ambos tratamientos (UNICT S4 y UB S16,

respectivamente; SM 1.6). Sin embargo, Agrigento y Tortorici fueron los clones con menor tolerancia a ambos niveles de salinidad.

Experimento II: "Respuesta de *A. donax* L. (C<sub>3</sub>) y *P. virgatum* L. (C<sub>4</sub>) a diferentes estreses"

Experimento IIa: Estrés hídrico y salinidad (Fig. 3.2.3)

Se realizaron cuatro tratamientos en *A. donax* L. "Martinensis" y *P. virgatum* L. "Alamo": (i) bien regadas sin salinidad (WW S-; Capacidad de campo (CC) a 1mS cm<sup>-2</sup>), (ii) estrés hídrico sin salinidad (WS S-; 25% CC a 1mS cm<sup>-2</sup>), (iii) bien regadas con salinidad (WW S+; CC a 16mS cm<sup>-2</sup>) y (iv) estrés hídrico con salinidad (WS S+; 25% CC a 16mS cm<sup>-2</sup>) durante dos meses.

Se obtuvieron valores similares de  $A_{sat}$  en ambas especies al comienzo del experimento (T0; Fig. 4.2.1a y SM 2.1) mientras que en otros parámetros como  $V_{c,max}$ ,  $J_{max}$ ,  $l$ ,  $g_s$ ,  $T$  y  $iWUE$  se obtuvieron diferencias significativas entre las especies (SM 2.1). De igual manera, *A. donax* L. presentó los mayores valores de  $F_v/F_m$ ,  $F_v'/F_m'$ ,  $\Phi_{PSII}$  mientras que *P. virgatum* L. presentó los mayores valores de NPQ y no se obtuvieron diferencias significativas en  $q_p$  (SM 2.1). *A. donax* L. disminuyó considerablemente  $A_{sat}$  en el tratamiento de WS S- (50%) a los 15 días, seguido por WW S+ y WS S+ (27% y 8%). Al final del experimento (T60) el descenso de  $A_{sat}$  en *A. donax* L. fue cercano al 91%, sin encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, en *P. virgatum* L. el descenso de  $A_{sat}$  no se observó hasta T45 (Fig. 4.2.1a), aunque no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Al finalizar el experimento (T60), el menor valor de  $A_{sat}$  se encontró en el tratamiento de doble estrés (WS S+), con un descenso del 95% respecto de T0. *P. virgatum* L. mostró menores valores de  $g_s$  que *A. donax* L. en el tratamiento control durante todo el experimento (Fig. 4.2.1b), y se observó una alta correlación entre  $A_{sat}$  y  $g_s$  en ambas especies en cada tratamiento (SM 2.2). Al contrario que  $g_s$ ,  $iWUE$  de *A. donax* L. fue menor que el de *P. virgatum* L. en condiciones control. En ninguna de las dos especies se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en T60 (Fig. 4.2.1c). El RWC de ambas especies disminuyó ligeramente entre T0 y T60 en el tratamiento control, pero sin encontrarse diferencias significativas. *A. donax* L. disminuyó su RWC en

aproximadamente 18% en todos los tratamientos respecto del control (Fig. 4.2.2) mientras que *P. virgatum* L. disminuyó un 21% en WS S- y WS S+ y solamente un 10% en WW S+. Al finalizar el experimento (T60), los menores valores de contenido de clorofila en *A. donax* L. se encontraron en los tratamientos con estrés hídrico (WS S- y WS S+), mientras que en *P. virgatum* L. no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (SM 2.3).

En relación a la biomasa, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos en la altura (*H*) de *A. donax* L., pero si en *P. virgatum* L., donde se observó una disminución en todos los tratamientos en relación al control, especialmente en el de doble estrés, con una disminución del 33%. Igualmente se observaron disminuciones en el número de hojas (NL) y por tanto en el área foliar (LA): *A. donax* L. disminuyó NL y LA un 76% y un 81%, respectivamente, en WS S- y *P. virgatum* L. un 78% y un 91%, respectivamente, en WS S+ (Table 4.2.1). La producción total de biomasa (TDW) también se vio afectada y disminuyó con respecto al control, siendo mas evidente en los tratamientos donde existía WS, al igual que el índice S/R. Se observó un descenso del índice S/R de 35% y de 13% en *A. donax* L. en los tratamientos WS S- y WS S+, respectivamente, mientras que *P. virgatum* L. se vió mas afectado (43 y 46%, respectivamente). El índice LMA aumentó en ambas especies como consecuencia del estrés (Table 4.2.1).

#### Experimento IIb: Temperatura y oscuridad continua (Fig. 3.2.4)

Se realizaron tres tratamientos en *A. donax* L. "Martinensis" y *P. virgatum* L. "Alamo": (i) Control (C, temperatura ambiente y luz), (ii) temperatura ambiente (24-26°C) y oscuridad continua (AD) y (iii) temperatura fría (5-6°C) y oscuridad continua (CD). Las mediciones se realizaron a los 3, 6 y 9 días de tratamiento y se estudió la recuperación a las 24h.

El tratamiento de frío (CD) trajo consigo una menor disminución de  $A_{\text{sat}}$  que el de temperatura ambiente (AD) en ambas especies (49% y 50% a los 3 días en *A. donax* L. y en *P. virgatum* L., respectivamente), aumentando con el tiempo (Table 4.2.2a,b). En el tratamiento CD se observó un descenso del 30% a los tres días en ambas especies, que, en *P. virgatum* L. permaneció constante hasta el final del experimento, y en *A. donax* L. disminuyó un 14% más (Table 4.2.2a).  $V_{\text{c,max}}$  también se vió menos afectada por las bajas

temperaturas: En *A. donax* L. se observaron descensos del 65% y del 43% en AD y CD, respectivamente, a los tres días, permaneciendo prácticamente constante a lo largo del tiempo. En *P. virgatum* L. estos descensos a los tres días fueron del 75% y del 66%, respectivamente. A los 9 días, el tratamiento AD disminuyó un 94% respecto de C, mientras que los valores del tratamiento CD permanecieron similares al control ( $P < 0,05$ ).  $J_{max}$  disminuyó un 90% en *A. donax* L. a los 9 días en ambos tratamientos, pero sufrió una recuperación completa tanto en CD como en AD. Sin embargo, en *P. virgatum* L. se observó un descenso del 81% en AD y un incremento del 52% en CD con respecto C (Table 4.2.2b).

Tanto en *A. donax* L. como en *P. virgatum* L. se observó una disminución de los parámetros de fluorescencia al comparar los datos de 9 días con el control en ambos tratamientos (excepto en el parámetro  $F_v/F_m$  de *A. donax* L. en el tratamiento AD).

Se observó un mayor efecto de AD que de CD en relación a la respiración mitocondrial en ambas especies (SM 2.4). A los 9 días, el consumo de  $O_2$  disminuyó un 77% en *A. donax* L. y un 73% en *P. virgatum* L. en el tratamiento AD, mientras que en el tratamiento CD la disminución fue de un 53% en *A. donax* L. y de un 11% en *P. virgatum* L. (Table 4.2.4; SM 2.4). La producción de  $CO_2$  también disminuyó a los 9 días al comparar con el control (90% y 81% en *A. donax* L. y *P. virgatum* L., respectivamente, en el tratamiento AD, y 74% y 33% en *A. donax* L. y *P. virgatum* L., respectivamente, en el tratamiento CD; Table 4.2.4). En relación al cociente respiratorio (RQ), se observó una disminución en ambos tratamientos y para las dos especies, con valores del 54% y 43% en *A. donax* L. y del 29% y 25% en *P. virgatum* L. en los tratamientos AD y CD, respectivamente.

Experimento III: "Marcaje isotópico con  $^{13}C$  y  $^{15}N$  para estudiar la respuesta de dos gramíneas perennes (*A. donax* L. y *P. virgatum* L.) a estrés hídrico" (Fig. 3.2.5)

Las plantas, tras 6 meses de crecimiento, se sometieron a tres tratamientos hídricos durante 21 días: (i) Control (C, 100% Capacidad de Campo), (ii) Estrés Moderado (MS, 50% CC) y (iii) Estrés Severo (SS, 25% FC).

Se encontraron diferencias significativas entre especies en los parámetros  $V_{c,max}$ ,  $J_{max}$ ,  $g_s$ ,  $T$ ,  $l$  y  $\Psi_{WUE}$  al comienzo del experimento ( $T_i$ ), mientras que  $A_{sat}$  y  $A_{max}$  permanecieron similares ( $P > 0,05$ ; SM 3.1). Se observaron descensos en  $A_{sat}$  (71% y 53%),  $A_{max}$  (65% y 48%),  $g_s$  (84% y 64%),  $T$  (84% y 62%),  $V_{c,max}$  (68% y 57%) y  $J_{max}$  (70% y 36%), en ambas especies (*A. donax* L. y *P. virgatum* L., respectivamente) en el tratamiento SS con respecto a C (Fig. 4.3.1), así como incrementos en  $l$  (89% y 100%) y  $\Psi_{WUE}$  (85% y 26%), respectivamente. Se encontraron fuertes correlaciones positivas entre  $g_s$  y  $A_{sat}$  y entre RWC y  $A_{sat}$ . Al igual que en los parámetros fotosintéticos, se observaron diferencias significativas entre especies en los parámetros de fluorescencia ( $F_v/F_m$ ,  $F'_v/F'_m$  y  $\phi_{PSII}$ ) en  $T_i$ , siendo mayores en *A. donax* L. que en *P. virgatum* L. (SM 3.1), menos en  $q_p$  y NPQ, donde tuvieron similares valores entre especies ( $P > 0.05$ ; SM 3.1). A su vez, también se observaron diferencias en ambas especies entre los tratamientos C y SS en  $T_f$ :  $F'_v/F'_m$  y  $\phi_{PSII}$  disminuyeron un 20% y un 40% en *A. donax* L. y un 11% y un 33% en *P. virgatum* L., respectivamente.  $q_p$  disminuyó un 25% en ambas especies mientras que NPQ se incrementó un 63% y un 28% en *A. donax* L. y en *P. virgatum* L., respectivamente. Por el contrario  $F_v/F_m$  no sufrió ninguna variación (Fig. 4.3.2).

Respecto al RWC, únicamente se observaron diferencias significativas entre los tratamientos entre el tratamiento SS y los tratamientos C y MS. *A. donax* L. mostró un menor descenso en RWC respecto a C (3% y 18% en MS y SS, respectivamente), mientras que *P. virgatum* L. disminuyó un 6 y un 49% en MS y SS respecto a C (Fig. 4.3.3).

En relación a los parámetros de biomasa, se observó un descenso en altura ( $H$ ) y en el número de tallos (NS) en ambas especies en  $T_f$  respecto a C, siendo más importantes en *P. virgatum* L., en el caso de la altura, y similares entre especies en el número de tallos (Table 4.3.1). El descenso en el número de hojas verdes (NGL) en relación con C fue muy importante en ambas especies (MS: 29% y 49%; SS: 65% y 74% en *A. donax* L. y *P. virgatum* L., respectivamente). Se observó un descenso importante en el área foliar (LA; Fig. 4.3.4a) y en el área de los tallos (SA). *P. virgatum* L. presentó mayores valores tanto de LA como de SA en cada tratamiento (SM 3.2). S/R disminuyó en *A. donax* L. (27% y 24% entre C-MS y MS-SS, respectivamente) pero no en *P. virgatum* L. ( $P = 0.825$ ; Fig.

4.3.4b). El peso total seco (TDW; Fig. 4.3.4c) también disminuyó en ambas especies: en *A. donax* L. disminuyó más con un mayor grado de estrés (26% entre C y MS y 41% entre MS y SS) mientras que TDW en *P. virgatum* L. disminuyó más en un nivel suave de estrés (47% entre C y MS y 30% entre MS y SS), aunque finalmente la diferencia entre SS y C fue prácticamente similar en ambas especies (57% y 63% en *A. donax* L. y *P. virgatum* L., respectivamente). El área de masa foliar (LMA, Kg m<sup>-2</sup>) fue similar en ambas especies en condiciones C, permaneciendo constante en *A. donax* L. al incrementarse el grado de estrés ( $P = 0,059$ ) mientras que en *P. virgatum* L. aumentó considerablemente (33% en MS en relación a C y 90% en SS en relación a MS; SM 3.2).

Los valores de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$  antes del marcaje (T0) fueron -29,4‰, -30,6‰, -29,1‰ y -28,8‰ en *A. donax* L. y -13,8‰, -14,0‰, -13,8‰ y -13,9‰ en *P. virgatum* L. para cada órgano (hoja, tallo, raíz y rizoma, respectivamente; Fig. 4.3.5a,b). En *A. donax* L. se observó un enriquecimiento con <sup>13</sup>C en cada órgano al aumentar el nivel de estrés (obteniéndose diferencias significativas entre C y SS en cada órgano, excepto en las hojas ( $P = 0.184$ )), mientras que en *P. virgatum* L. no se observaron. Tras el marcaje (T1) todos los órganos sufrieron un enriquecimiento en <sup>13</sup>C, siendo el tallo el órgano con mayor  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$  en ambas especies. Los valores de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$  en T2 disminuyeron respecto de T1. El tratamiento C fue el más empobrecido en <sup>13</sup>C que los tratamientos de estrés (MS y SS) en todos los órganos. En general, el tallo siguió siendo el órgano con mayor  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$  en cada tratamiento, excepto en el tratamiento C y SS de *A. donax* L., donde no se observaron diferencias significativas entre los órganos ( $P = 0,264$  y  $0,410$ , respectivamente).

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en el contenido de C ( $C_c$ ; % mg<sup>-1</sup>) de raíces y rizomas en ambas especies (SM 3.3). Sin embargo, en *A. donax* L. se encontraron diferencias significativas en las hojas ( $P = 0,045$ ) pero no en los tallos ( $P = 0,082$ ) y en *P. virgatum* L. se encontraron diferencias significativas en los tallos ( $P = 0.014$ ) pero no en las hojas ( $P = 0,860$ ). En general, hojas y tallos fueron los órganos con menor y mayor ratio  $C_c/N_c$  respectivamente en ambas especies. Además, en general se observó un mayor ratio  $C_c/N_c$  en *P. virgatum* L. que en *A. donax* L. (SM 3.3).

Los valores de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TSS}}$  antes del marcaje (T0) en condiciones C fueron -30,5‰, -29,7‰, -28,2‰ y -27,7‰ en *A. donax* L. y -13,8‰, -13,4‰, -12,7‰ y -12,6‰ en *P. virgatum* L. para cada órgano (hoja, tallo, raíz y rizoma, respectivamente; Fig. 4.3.6a,b). Se observó un enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  en cada órgano de *A. donax* L. conforme aumentaba el grado de estrés, aunque solamente se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos C y SS (excepto en los tallos ( $P = 0,087$ )), mientras que en *P. virgatum* L. estas diferencias sólo se encontraron en las hojas ( $P = 0,016$ ). Tras el marcaje (T1), todos los órganos se enriquecieron en  $^{13}\text{C}$  en ambas especies en condiciones C (Fig. 4.3.6a,b), al igual que se observó un enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  en ambas especies y en cada órgano al aumentar el nivel de estrés. Sin embargo, los órganos empobrecieron en  $^{13}\text{C}$  entre T1 y T2 en ambas especies en los tres tratamientos (C, MS y SS), siendo mayor en *A. donax* L. que en *P. virgatum* L. .

En relación a la composición isotópica del  $\text{CO}_2$  respirado ( $\delta^{13}\text{C}_R$ ), los valores obtenidos antes del marcaje (T0) en condiciones C fueron -21,5‰, -19,2‰, -20,7‰ y -22,5‰ en *A. donax* L. y -12,8‰, -12,9‰, -13,3‰ and -13,1‰ en *P. virgatum* L. para cada órgano (hoja, tallo, raíz y rizoma, respectivamente; Fig. 4.3.7a,b). Se observó un enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  en cada órgano como consecuencia del estrés, pero sólo se observaron diferencias significativas entre los tratamientos C y SS en tallos y raíces de *A. donax* L. ( $P = 0,041$  y  $0,029$ , respectivamente). Se produjo un enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  tras el marcaje (T1) en ambas especies y en cada órgano conforme aumentaba el nivel de estrés, excepto en las hojas de *A. donax* L., aunque sin diferencias significativas entre los tratamientos ( $P = 0,229$ ). Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en los tallos de *A. donax* L. y en todos los órganos de *P. virgatum* L. . El rizoma de *A. donax* L. fue el órgano cuya respiración estaba más enriquecida en  $^{13}\text{C}$ , mientras que en *P. virgatum* L. los valores fueron más similares entre los órganos para cada tratamiento. Los valores de  $\delta^{13}\text{C}_R$  se empobrecieron en  $^{13}\text{C}$  entre T1 y T2 en condiciones C (Fig. 4.3.7), al igual que el tratamiento C fue el más empobrecido en relación con MS y SS, excepto en las hojas de *A. donax* L. ( $P = 0,132$ ) y en los tallos de *P. virgatum* L. . A su vez,  $R_d$  disminuyó en ambas

especies conforme aumentaba el estrés en raíces y rizomas, pero no en hojas de ambas especies ( $P = 0,072$  y  $0,407$ , respectivamente) ni en tallos de *P. virgatum* L. ( $P = 0,052$ ). La raíz y el rizoma de *A. donax* L. fueron los órganos con mayor y menor  $R_d$ , respectivamente, mientras que la  $R_d$  de los rizomas de *P. virgatum* L. fue tan elevada como la de las raíces (SM 3.3).

Los valores de  $\delta^{15}N_{TOM}$  en condiciones C a T0 de *A. donax* L. fueron  $+3,6\text{‰}$ ,  $+6,4\text{‰}$ ,  $+9,9\text{‰}$  and  $+0,6\text{‰}$ , y de *P. virgatum* L.  $+3,0\text{‰}$ ,  $+3,6\text{‰}$ ,  $+1,5\text{‰}$  y  $+0,6\text{‰}$  para cada órgano (hoja, tallo, raíz y rizoma, respectivamente; Fig. 4.3.8a,b). En general, se observó un enriquecimiento en  $^{15}N$  en los tallos de ambas especies al comparar con los otros órganos, sobre todo con los rizomas. Tras el marcaje (T1), el aumento de  $\delta^{15}N_{TOM}$  alcanzó valores de  $+790,4\text{‰}$ ,  $+1447,9\text{‰}$ ,  $+1187,1\text{‰}$ ,  $+1274,0\text{‰}$  y  $+428,0\text{‰}$ ,  $+961,9\text{‰}$ ,  $+652,0\text{‰}$ ,  $+1254,4\text{‰}$  en hojas, tallos, raíces y rizomas de *A. donax* L. y *P. virgatum* L. en condiciones C, respectivamente (Fig. 4.3.8a,b). En general, ambas especies sufrieron empobrecimiento en  $^{15}N$  en cada órgano al incrementarse el nivel de estrés. Las hojas fueron los órganos con menores valores de  $\delta^{15}N_{TOM}$  en ambas especies. En T2, los valores de  $\delta^{15}N_{TOM}$  disminuyeron en relación a T1 en los órganos de ambas especies excepto en las hojas, donde aumentaron un 5% (*A. donax* L.) y un 64% (*P. virgatum* L.). En general no se observaron diferencias significativas entre T1 y T2 en la mayoría de los órganos de ambas especies para cada tratamiento.

Las hojas de ambas especies fueron los órganos con mayor contenido de Nitrógeno ( $N_c$ ), sobre todo en *A. donax* L. . Al aumentar el nivel de estrés se observaron descensos en  $N_c$  de las hojas de *A. donax* L. (10% en MS y 22% en SS en relación con C), mientras que en *P. virgatum* L. no se observa este descenso en las hojas, aunque se produjo un aumento en  $N_c$  en tallos (20% en MS y 91% en SS en relación a C) y rizomas (15% en MS y 32% en SS en relación a C; SM 3.3).

## **DISCUSIÓN**



En la discusión general de esta Tesis se pretenden discutir los resultados de una forma integrada. Se discutirán los siguientes apartados:

- Estudiar las características fisiológicas de ambas especies de gramíneas perennes (*A. donax* L. y *P. virgatum* L.) en condiciones de control.
- Observar diferencias fisiológicas entre ambas especies, considerando que *A. donax* L. es una especie  $C_3$  y *P. Virgatum* L. una especie  $C_4$ .
- Estudiar la respuesta fisiológica de éstas gramíneas perennes a diferentes condiciones estresantes, como son el estrés hídrico, salino y por bajas temperaturas y oscuridad.
- Estudiar el efecto del estrés sobre la producción de biomasa.
- Evidenciar el uso de isótopos estables como medidores de estrés y su uso para trazar la partición de éstos a través de la planta.
- Sugerir futuras líneas de investigación de acuerdo a los resultados obtenidos.

### **5.1.- Respuesta de las gramíneas perennes en condiciones control**

En primer lugar, realizaremos una caracterización fisiológica de ambas especies de gramíneas perennes (*A. donax* L. y *P. virgatum* L.) en condiciones controladas y óptimas de crecimiento.

Como ya hemos comentado, las especies vegetales estudiadas en esta Tesis se caracterizan por tener distintos tipos de vías metabólicas respecto a la asimilación del carbono. Este hecho condiciona los resultados obtenidos en los distintos experimentos.

En relación al intercambio gaseoso en condiciones control, se han observado diferencias entre ambas especies en parámetros como la conductancia estomática ( $g_s$ ), la limitación estomática ( $l$ ), la transpiración ( $T$ ) y la eficiencia instantánea en el uso del agua ( $iWUE$ ; Fig. 4.2.1 y SM 3.1). Los menores valores de  $g_s$ ,  $l$  y  $T$ , así como el mayor valor de  $iWUE$  en *P. virgatum* L. ( $C_4$ ) que en *A. donax* L. ( $C_3$ ) son consecuencia de la menor concentración de  $CO_2$  intercelular que se necesita para saturar la carboxilación de la enzima Rubisco. Es decir, el mecanismo de concentración de  $CO_2$  propio de las especies  $C_4$  aumenta la

eficiencia fotosintética de éstas especies respecto a las  $C_3$ , reduciendo la fotorrespiración y limitando la pérdida de agua, manteniendo a su vez la absorción de carbono por las hojas (Osmond y col., 1982; Edwards y Walker, 1983).

Sin embargo, en ambos experimentos no se observaron diferencias entre las especies en la tasa fotosintética ( $A_{sat}$ ; Fig. 4.2.1 y SM 3.1). Los valores de  $A_{sat}$  obtenidos en *A. donax* L. son similares a los recogidos en otros estudios con esta misma especie (Papazoglou y col., 2005; Nackley y col., 2014), lo que confirmaría el alto potencial fotosintético de *A. donax* L., tal y como mencionan Rossa y col. (1998), Papazoglou y col. (2005), Ceotto y col. (2013) y Nackley y col. (2014). Al mismo tiempo, los valores de  $A_{sat}$  y  $g_s$  de *P. virgatum* L. son similares a los obtenidos por Albaugh y col. (2014). *A. donax* L. mostró una mayor eficiencia en la fluorescencia lumínica de la clorofila que *P. virgatum* L. (SM 3.1), debido a que las especies  $C_3$  necesitan menores requerimientos de energía para fijar el  $CO_2$  (Percy y Ehleringer, 1984; Lambers y col., 1998; Nippert y col., 2007).

Por lo tanto, en condiciones controladas, el mecanismo de concentración de  $CO_2$  de *P. virgatum* L. ( $C_4$ ) supuso una mejora en los parámetros fotosintéticos como  $g_s$ ,  $I$ ,  $T$  y  $\Psi WUE$  aunque no se vio reflejado en una mayor  $A_{sat}$ , dado que *A. donax* L. ha sido catalogada como una especie  $C_3$  con un alto potencial fotosintético, similar al de una  $C_4$ . A su vez, *A. donax* L. ha mostrado una mayor eficiencia cuántica en el transporte de electrones que *P. virgatum* L. .

Aun teniendo en cuenta las diferencias explicadas en las rutas metabólicas del C de estas especies, el contenido relativo de agua (RWC, "Relative Water Content" en inglés) ha sido similar en ambas especies en condiciones control (Fig. 4.2.2 y Fig. 4.3.3). Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas en el contenido de clorofilas de ambas especies, siendo mayor en *A. donax* L. que en *P. virgatum* L. (SM 2.3), tal y como se esperaba según Taylor y col. (2011).

Hoy en día, determinar la composición isotópica de las plantas es considerado como una forma rápida y sencilla de comprobar la vía metabólica del C de las plantas. Esto se debe a que la PEPc, que es la principal enzima carboxiladora en la vía  $C_4$ , presenta un efecto

isotópico cinético diferente que la enzima Rubisco en las especies  $C_3$ . A su vez, utiliza una especie de carbono inorgánico ( $HCO_3^-$ ) que tiene una composición isotópica en equilibrio diferente de la que presenta la Rubisco en las especies  $C_3$  (Farquhar y col., 1989). Por lo tanto, según Ghashghaie y col. (2003) la composición isotópica del carbono en la materia orgánica ( $\delta^{13}C_{TOM}$ ) varía entre -7 y -35‰, en función de la ruta metabólica. Estos mismos autores indican que  $\delta^{13}C_{TOM}$  en plantas  $C_3$  se sitúa entre -24 y -30‰ mientras que según Badeck y col. (2005) la de las especies  $C_4$  se sitúa en valores entre -9 y -20‰, tal y como se ha observado en los resultados (Fig. 4.3.8). Por lo tanto, se ha confirmado cómo en condiciones control las plantas  $C_3$  están más empobrecidas en  $^{13}C$  que las especies  $C_4$ , tal y como mencionan Ghashghaie y col. (2003), Hobbie y Werner (2004) y Badeck y col. (2005). En el apartado 5.3 de esta discusión se puede obtener más información sobre el uso de isótopos estables en ecofisiología y sobre los resultados del uso de esta técnica en ambas especies de gramíneas perennes.

El hecho de que los tallos de *P. virgatum* L. presenten los menores contenidos de N (incluso en condiciones de estrés; SM 3.3), pero manteniendo altos valores tanto del ratio  $C_c/N_c$  como del marcaje con  $^{13}C$  confirmaría que este órgano es un importante sumidero de C.

Los resultados (SM 3.3) han mostrado un menor contenido de  $N_c$  en las hojas de las especies  $C_4$  en relación con las  $C_3$  para la misma tasa fotosintética en condiciones control, al igual que Turner y col. (1995). Esto sería consecuencia de la mayor actividad específica de la Rubisco en las especies  $C_4$  (hasta dos veces más) que en las especies  $C_3$  como consecuencia de una menor fotorrespiración (Sage y col., 1987; Ghannoum y col., 2011). Es decir, se necesitaría mucha menos cantidad de Rubisco para alcanzar altas tasas fotosintéticas en las especies  $C_4$  que en las especies  $C_3$ . Sage y col. (1987) demostraron cómo entre el 15% y 30% del N total de las hojas de plantas  $C_3$  está en la Rubisco, mientras que en especies  $C_4$  ese valor disminuye hasta el 6% y el 9%.

En relación a la morfología de estas especies de gramíneas perennes, *A. donax* L. se caracteriza por ser una planta muy alta con pocos tallos y hojas anchas (Table 4.1.1, Table

4.2.1 y Table 4.3.1), mientras que *P. virgatum* L. ha demostrado ser una planta más pequeña, pero con una gran cantidad de tallos y hojas estrechas (Table 4.2.1 y Table 4.3.1).

Una de las características buscadas en los cultivos bioenergéticos es que éstas especies posean altas tasas de crecimiento relativo, así como una alta productividad de materia seca (TDW; Barney y col., 2009). En esta Tesis hemos observado cómo, teniendo ambas especies una alta producción de biomasa, ha sido *P. virgatum* L. la especie con mayor área foliar (LA) así como mayor TDW en condiciones controladas óptimas (Table 4.2.1 y Fig. 4.3.4). A su vez, *P. virgatum* L. ha sido la especie con mayor desarrollo radicular en ambos experimentos (con menor S/R; Fig. 4.3.4), característica positiva en los cultivos bioenergéticos, ya que implica una menor erosión y una mayor captura de C en el suelo (Lewandowski y col., 2003; Heaton y col., 2004; Fagnano y col., 2015).

Por lo tanto, las diferencias morfológicas de ambas especies y la mayor producción de biomasa de *P. virgatum* L. en condiciones control serían una posible consecuencia de la mayor eficiencia fotosintética debido al mecanismo de concentración de CO<sub>2</sub> (Edwards y Walker, 1983; Beale y col., 1999; Ghannoum, 2009).

## **5.2.- Respuesta de las gramíneas perennes en condiciones de estrés**

Las plantas muestran una amplia flexibilidad de respuestas fisiológicas a condiciones ambientales variables. En nuestro caso, la respuesta fisiológica frente al estrés, tanto hídrico, como salino y a las bajas temperaturas y la oscuridad ha sido diferente en las dos especies de gramíneas perennes estudiadas. Estas respuestas han sido condicionadas, en parte, por las características propias de cada especie, como por ejemplo, su distinta vía metabólica del C, ya que como se ha comentado anteriormente, *A. donax* L. está caracterizada como especie C<sub>3</sub> y *P. virgatum* L. como especie C<sub>4</sub>.

### 5.2.1.- Respuesta al estrés hídrico

El efecto del estrés hídrico en estas especies ha sido una parte importante de esta Tesis, debido a que es uno de los factores ambientales que afectan más negativamente a la productividad, sobre todo en ambientes Mediterráneos (Araus y col., 2002).

En los resultados (puntos 4.1, 4.2 y 4.3) hemos comprobado cómo ambas especies se han visto afectadas por el efecto del estrés hídrico, tanto severo (Exp. I, II y III) como moderado (Exp. III).

Uno de los efectos más estudiados del estrés hídrico es el descenso en  $A_{\text{sat}}$  (Cabrera-Bosquet y col., 2007; Chaves y col., 2009; Ashraf y Harris, 2013). Estudios sobre fotosíntesis bajo condiciones de estrés hídrico han mostrado descensos en  $A_{\text{sat}}$  y  $g_s$  tanto en otras especies vegetales (Cornic y Massacci, 1996; Escalona y col., 1999) como en *A. donax* L. (Mann y col., 2013) y en *P. Virgatum* L. (Barney y col., 2009). Flexas y Medrano (2002) describieron que  $g_s$  es uno de los parámetros que mejor reflejan el estado hídrico de la planta, y es a su vez uno de los primeros parámetros afectados por estrés hídrico (Flexas y col., 2004). La disminución de  $g_s$  (y por tanto el cierre estomático) como consecuencia del estrés hídrico viene dado por el aumento de ácido abscísico (ABA) en las hojas (Mittelheuser y van Steveninck, 1969), reduciendo la presión parcial interna de  $\text{CO}_2$  ( $c_i$ ) y, por tanto,  $A_{\text{sat}}$ .

Esta relación entre  $A_{\text{sat}}$  y  $g_s$  se ha demostrado en los experimentos debido a la alta correlación entre ambos parámetros (SM 1.1, SM 2.2 y Fig. 4.3.1). Es decir, frente a una disminución de la disponibilidad de agua las plantas, tanto *A. donax* L. como *P. Virgatum* L. respondieron con un cierre estomático, disminuyendo la tasa de carboxilación (Flexas y col., 2004). Es remarcable el hecho de que ambas especies muestren una elevada reducción de  $g_s$  con respecto a la reducción del RWC (Fig. 4.1.1 y Fig. 4.1.2; Fig. 4.2.1 y Fig. 4.2.2 y Fig. 4.3.1 y Fig. 4.3.3). Esta rápida respuesta estomática a la disminución del contenido hídrico del suelo permitiría a las plantas retrasar la pérdida de agua, lo que indicaría que, según esta característica, podrían ser consideradas como especies que evitan la deshidratación (Gulías y col., 2002; Li y col. 2004). Según diversos autores, tanto

*A. donax* L. como *P. Virgatum* L. han sido definidas como especies tolerantes a la sequía (Lewandowski y col., 2003; Stroup y col., 2003; Cosentino y col., 2014). Sin embargo, nuestros resultados (el rápido efecto del estrés hídrico en *A. donax* L. y los elevados valores de  $A_{\text{sat}}$ ,  $g_s$  y  $\lambda$ WUE encontrados en *P. Virgatum* L. en comparación con *A. donax* L. tras dos meses de estrés hídrico; Fig. 4.2.1) indicarían una mayor tolerancia de *P. Virgatum* L. a este tipo de estrés en condiciones controladas, en concordancia con lo expresado en Quinn y col. (2015). Sanderson y col. (1999) describieron a *P. Virgatum* L. como una especie generalmente muy tolerante a una sequía moderada o incluso extrema mientras que Mann y col. (2013) y Lambert y col. (2014) describieron a *A. donax* L. como una especie no tolerante, pero capaz de sobrevivir a la sequía.

Uno de los efectos del cierre estomático debido al estrés hídrico es la reducción de la transpiración (Fig. 4.3.1), lo cual indicaría una disminución en la refrigeración que sufre la superficie de la hoja debido a la evaporación (Farooq y col., 2009; Mann y col., 2013). Esto, unido al descenso de  $A_{\text{sat}}$  como consecuencia del estrés hídrico, hace que la energía sobrante absorbida por las hojas sea disipada como calor, observándose un aumento del *quenching* no fotoquímico (NPQ; Fig. 4.3.2) como mecanismo de fotoprotección del núcleo del PSII (Takahashi y Badger, 2011).

En relación a  $\lambda$ WUE, ambas especies lo incrementaron como consecuencia del estrés hídrico (Fig. 4.3.1). Ghannoum y col. (2002) señalan que, dentro las especies  $C_4$ , las pertenecientes al grupo NAD-ME (como es *P. virgatum* L.) tienden a incrementar la eficiencia del uso del agua en condiciones de estrés hídrico mucho más que las pertenecientes al grupo NADP-ME. Además, Nickell (1972), Ghannoum y col. (2002) y Zangh y col. (2011), describieron que los ecotipos catalogados como "lowland" y NAD-ME, como es el caso de *P. virgatum* L. "Alamo", presentan alta tolerancia al estrés hídrico, tal y como hemos comprobado con los datos de fotosíntesis. De acuerdo con Stroup y col. (2003), los cultivares "lowland", y en especial el ecotipo "Alamo", son más capaces de adaptarse a condiciones ambientales adversas, como por ejemplo estrés

hídrico o bajo contenido de nitrógeno en el suelo, llegando a la conclusión de que estos ecotipos presentan un mejor potencial de crecimiento que los ecotipos "upland".

Aun así, el descenso de la tasa fotosintética en condiciones de estrés en ambas especies (sobre todo en el Exp. III) hace que la ventaja fotosintética característica de las especies  $C_4$  frente a las  $C_3$  en condiciones control se haya visto reducida en condiciones de estrés hídrico, tal y como menciona Taylor y col. (2011). De acuerdo con Lawlor (2002), a altos valores de RWC, la mayoría de los electrones son utilizados en la asimilación del  $CO_2$ , y en menor proporción en la fotorrespiración y la reacción de Mehler, que es la reducción de oxígeno molecular a agua oxigenada cuando los cloroplastos están expuestos a la luz. Sin embargo, cuando el contenido relativo del RWC disminuye, una mayor proporción de electrones son usados en estos dos últimos procesos. Esto es corroborado por Ghannoum (2009), quien sugiere que debe existir una capacidad limitada para la fotorrespiración, o para la reacción de Mehler, para actuar como un sumidero alternativo y significativo de electrones bajo condiciones de estrés hídrico en la fotosíntesis de las especies  $C_4$ . Esto explicaría por qué las especies  $C_4$  son afectadas por el estrés hídrico a pesar de su alta capacidad fotosintética y de eficiencia en el uso del agua.

Por lo tanto, el efecto del estrés hídrico sobre la fotosíntesis en ambas especies en condiciones controladas ha sido más importante en la especie  $C_3$  (sobre todo a largo plazo), indicando que el mecanismo de concentración de  $CO_2$  de las especies  $C_4$  les confiere una ventaja en su adaptación a ambientes con poca agua (Sage, 2004).

Además de  $g_s$ , también existen otros parámetros que aportan información sobre el estado hídrico de la planta, como son el RWC y la discriminación isotópica del  $^{13}C$  ( $\Delta^{13}C$ ). La pérdida de turgencia en las células vegetales como consecuencia del estrés hídrico ha generado descensos en el RWC en ambas especies, en nuestros experimentos (*A. donax* L. y *P. Virgatum* L. (Fig. 4.1.2, Fig. 4.2.2 y Fig. 4.3.3) como en otros (Stroup y col., 2003; Nackley y col., 2014). La mayor correlación entre  $A_{sat}$  y  $g_s$  que entre  $A_{sat}$  y el RWC en ambas especies (Exp. III) indicaría cómo los parámetros relacionados con la fotosíntesis

son más dependientes de  $g_s$  que del RWC. Este hecho también se ha observado en otras especies (Sharkey, 1990; Medrano y col., 2002).

De acuerdo a Cornic y Massacci (1996), el daño bioquímico en el aparato fotosintético es significativo solamente cuando el déficit de agua en la hoja alcanza el 30%. Por lo tanto, de acuerdo a estos autores y según nuestros resultados, ambas especies vieron reducido el RWC como consecuencia del estrés hídrico, pero ni *A. donax* L. ni *P. Virgatum* L. habrían experimentado daño en el aparato fotosintético. Los valores constantes de  $F_v/F_m$  (Fig. 4.3.2) indican que los procesos de transporte electrónico no han sido afectados por el estrés hídrico ni se ha producido fotoinhibición en los centros de reacción del PSII (Lawlor y Cornic, 2002). Este hecho confirmaría que la reducción de  $A_{sat}$  se debe a la disminución de  $g_s$ , y no a la disminución de la tasa de transporte electrónico (Cornic y col., 1992).

En relación a la discriminación isotópica del  $^{13}\text{C}$  ( $\Delta^{13}\text{C}$ ), en el experimento III se observó un enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  (o un descenso en la discriminación isotópica de la fotosíntesis) en *A. donax* L. tanto en los azúcares solubles totales (TSS, "Total Soluble Sugars" en inglés), como en la materia orgánica total (TOM, "Total Organic Matter" en inglés) y en el  $\text{CO}_2$  respirado ( $C_R$ ; Fig. 4.3.5, Fig. 4.3.6 y Fig. 4.3.7). De acuerdo con Farquhar y col. (1989) y Ghashghaie y col. (2003), este enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  es consecuencia de la disminución de  $g_s$ , que a su vez produce una disminución en  $C_i$ . Conforme  $C_i$  disminuye, el  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  dentro de la hoja se va enriqueciendo progresivamente, y, por lo tanto, los productos de la fotosíntesis se ven a su vez enriquecidos (Marshall y col., 2007). Por lo tanto, la discriminación isotópica del  $^{13}\text{C}$  durante la fotosíntesis disminuye en condiciones de estrés en especies  $C_3$ , como *A. donax* L. (Fig. 4.3.5a). Sin embargo, este descenso de la discriminación isotópica del  $^{13}\text{C}$  durante la fotosíntesis en condiciones de estrés no se observó en *P. virgatum* L. (Fig. 4.3.5b)., probablemente porque la disminución de  $g_s$  en condiciones de estrés en esta especie fue menor que en *A. donax* L (Fig. 4.3.1). Es decir, la discriminación isotópica del C durante la fotosíntesis como consecuencia del estrés hídrico estaría ampliamente relacionada con  $g_s$ . En el punto 5.3 de esta discusión se

puede obtener más información sobre el uso de isótopos estables en ecofisiología y sobre los resultados del uso de esta técnica en ambas especies de gramíneas perennes sometidas a estrés hídrico.

Según Carter y Knapp (2001), las plantas sometidas a cualquier tipo de estrés tienden a perder capacidad fotosintética y disminuir el contenido de clorofila. Esta disminución observada en *A. donax* L. debido al estrés hídrico (SM 1.2 y SM 2.3), así como en otras especies  $C_3$  como el arroz (Chutia y Borah, 2012) pudo ser debida a un incremento en la degradación de la clorofila o a una disminución en su síntesis. Sin embargo, *P. virgatum* L. (SM 2.3) no sufrió una disminución debido al estrés hídrico, hecho que sí se ha observado en otras especies  $C_4$ , como maíz (Sánchez y col., 1983) o el sorgo (Jagtap y col., 1998).

Según Chaves y col. (2009), dos de los primeros procesos afectados por el estrés hídrico en la planta son el crecimiento celular y la tasa fotosintética. La disminución del tamaño de la planta, así como del área foliar, es uno de los mecanismos de la planta para limitar el uso del agua e intentar así reducir el daño por estrés hídrico (Blum, 2005). Los resultados muestran cómo el estrés hídrico ha afectado considerablemente la producción de biomasa en ambas especies, mostrando descensos en parámetros como la altura ( $H$ , cm), el número de hojas (NL), el número de tallos (NS), el área foliar (LA), el peso seco total (TDW) al igual que en índices como la relación entre el peso seco de la parte aérea y de la parte subterránea (S/R), el área foliar específica (SLA) o el ratio de área foliar (LAR; Table 4.1.1, Table 4.1.2, Table 4.2.1, Table 4.3.1, Fig. 4.3.4 y SM 3.2).

La relación entre el peso seco de la parte aérea (S, "Shoot" en inglés) y de la parte subterránea (R, "Root" en inglés) también se ha visto afectada por el estrés hídrico, produciéndose un descenso del índice S/R (Table 4.1.2, Table 4.2.1 y Fig. 4.3.4). De acuerdo con Maroco (2000), Blum (2005) y Munns y Tester (2008), nuestros datos también han demostrado una mayor disminución del peso seco de la parte aérea que de la parte subterránea, acercándose a los datos obtenidos por Mann y col. (2013), que indicaría el

mantenimiento de un desarrollado sistema radicular en condiciones de estrés hídrico con la finalidad de buscar fuentes de agua profundas (Lewandowski y col., 2003).

Como hemos comentado con anterioridad, la producción de biomasa, medida por TDW se ha visto afectada por el estrés hídrico, disminuyendo considerablemente en ambas especies (Fig. 4.1.3, Table 4.2.1 y Fig. 4.3.4). En periodos breves de estrés hídrico (21 días; Fig. 4.3.4), la producción de biomasa de *P. Virgatum* L. ha sido ampliamente mayor a la de *A. donax* L., incluso con valores menores o iguales de fotosíntesis (tratamiento *MS* y *SS*, respectivamente). Sin embargo, en periodos más largos de estrés hídrico (2 meses; Table 4.2.1), la producción de biomasa de *P. Virgatum* L. ha sido similar a la de *A. donax* L. aunque la tasa fotosintética ha sido mucho mayor. Esta reducción del tamaño de la planta sería un mecanismo de *P. Virgatum* L. para restringir el consumo de agua por los tejidos y así poder mantener la asimilación de C (Chaves y col., 2009). Otro de los mecanismos de la planta para ser más eficiente a la hora de controlar las pérdidas de agua es la modificación de la anatomía de la hoja, haciéndolas más pequeñas y gruesas (Ericc y col., 2010). Este hecho se observa en el descenso del área foliar específica (SLA) en ambas especies (Table 4.1.2, Table 4.2.1, SM 3.2). Es decir, el estrés hídrico ha traído consigo una disminución de la producción de biomasa así como modificaciones en la anatomía foliar, generando hojas más pequeñas y más gruesas.

El descenso en  $N_c$  de las hojas como consecuencia del estrés hídrico (SM 3.3) podría ser consecuencia de una disminución en el contenido de Rubisco (Lawlor, 2002) o de la reducción de la transpiración. Esto último vendría explicado por el hecho de que la baja reducción de  $N_c$  en las hojas (menor del 17%) respecto a la reducción de  $g_s$  (84%), sugiere que la reducción de  $N_c$  fue una consecuencia de la baja absorción de agua por las raíces como resultado de la reducción de la transpiración (Gulías y col., 2002).

### **5.2.2.- Respuesta al estrés salino**

La salinidad es uno de los desafíos más importantes que enfrenta el suministro de alimentos para la población mundial en un futuro (Wilhem, 2014). Es, por tanto, necesario

conocer la respuesta fisiológica de las plantas frente a este estrés, con la finalidad de mejorar la producción.

En los resultados de esta Tesis (puntos 4.1 y 4.2) hemos comprobado cómo ambas especies se han visto afectadas por el efecto del estrés salino, tanto severo (Exp. I, II) como a niveles crecientes de salinidad (Exp. Ib).

El aumento de la salinidad en el suelo produce un efecto osmótico de la sal alrededor de las raíces, generando una pérdida de agua en las células de las hojas y, por tanto, disminuyendo su crecimiento. Ésta pérdida de agua en las células se hace más importante conforme aumenta el tiempo de estrés (Munns y Tester, 2008), llegando a producir efectos similares a la sequía incluso en plantas tolerantes a la salinidad (Munns, 2002). La disminución del tamaño de la planta (medida como LA; Table 4.1.1, Fig. 4.1.5 y Table 4.2.1) en relación al tamaño de las raíces disminuiría el uso del agua de las plantas, manteniendo así la humedad del suelo y su vez, previniendo el aumento de la salinidad en el suelo. Por tanto, según Liu y Stützel (2002) y Munns y Tester (2008), la disminución del tamaño de las plantas como consecuencia del estrés salino podría ser una estrategia de la planta para reducir el daño producido, al igual que ocurría en el estrés hídrico.

Por el contrario, cuando una planta absorbe altas cantidades de sal los primeros síntomas de daño aparecen en las hojas más antiguas, produciéndose una mayor tasa de hojas antiguas muertas que de formación de hojas nuevas. Esta descompensación trae consigo que la capacidad fotosintética de la planta no sea capaz de aportar los requerimientos de carbohidratos necesarios por las hojas jóvenes para su correcto desarrollo, disminuyendo por tanto su crecimiento, tal y como se observa en ambas especies.

Según Munns y col. (2006), uno de los mayores efectos de la salinidad en el comportamiento de las plantas es la disminución de  $A_{\text{sat}}$  (Fig. 4.1.1, Fig. 4.1.4a, Fig. 4.1.4b, Fig. 4.2.1a). Munns (2002), Rivelli y col. (2002), Centritto y col. (2003), Flexas y col. (2004), Munns y Tester (2008) y Ashraf y Harris (2013) añaden que las plantas, frente a condiciones de salinidad, responden con un cierre estomático, disminuyendo por tanto la tasa de asimilación de C. De acuerdo con todos estos autores, los resultados obtenidos

han mostrado un descenso en  $A_{\text{sat}}$  como consecuencia de la salinidad tanto en *A. donax* L. (a un estrés salino a lo largo del tiempo (Fig. 4.1.1) como a niveles de salinidad creciente (Fig. 4.1.4a y Fig. 4.1.4b)) como en *P. virgatum* L. (Fig. 4.2.1a). A su vez, se ha demostrado cómo el descenso de  $g_s$  es previo al de  $A_{\text{sat}}$ , (Fig. 4.1.1, Fig. 4.1.4a, Fig. 4.1.4b), concordando con los resultados de Centritto y col. (2003), Munns y Tester (2008) y Yousfi y col. (2009), donde se concluye que una de las primeras respuestas al estrés moderado es el descenso en  $g_s$  con el fin de reducir las pérdidas de agua. Por lo tanto, ha quedado demostrado una correlación fuerte y positiva entre ambos parámetros ( $A_{\text{sat}}$  y  $g_s$ ), pero a su vez una correlación negativa de ambos parámetros a lo largo del tiempo (SM 1.1).

Según Cornic y Massaci (1996) y Flexas y col. (2004) otro de los efectos del estrés salino en la planta es la disminución del RWC, al igual que el descenso en clorofilas (Santos, 2004; Fig. 4.1.2 y Fig. 4.2.2). En relación a la producción de biomasa, el estrés salino ha implicado un descenso en los parámetros de crecimiento, tales como *H*, NL, NS, TDW y en índices como *S/R* o *SLA*, tanto a bajos (Fig. 4.1.5) como a altos niveles de salinidad (Table 4.1.1, Fig. 4.1.3, Table 4.1.2, Fig. 4.1.5, Table 4.2.1), de acuerdo con Liu y Stützel (2002), Munns (2002) y Munns y Tester (2008). Munns y col. (2002) relacionan esta parada de crecimiento de la planta con cambios en las tasas de elongación de las células debido al estado hídrico de las hojas.

Al comparar el efecto de la salinidad en las dos especies (Exp. II) observamos cómo, tras dos meses de estrés salino, la tasa fotosintética de *P. virgatum* L. es mayor (aproximadamente 5 veces más) que la de *A. donax* L. (Fig. 4.2.1a), indicando un menor efecto de la salinidad en condiciones controladas en *P. virgatum* L. ( $C_4$ ) que en *A. donax* L. ( $C_3$ ). Long y col. (1975) y Sage (2001) sugirieron que las especies con ruta metabólica  $C_4$  podrían tener más ventajas para sobrevivir en hábitats donde la disponibilidad de agua fuera un limitante o donde estuviera presente la salinidad debido al mayor ratio de  $\text{CO}_2$  asimilado en relación al agua transpirada que las especies  $C_3$ . En relación a esto, Stepien y Klobus (2005) describieron un mayor efecto de la salinidad en las especies  $C_3$  que en

especies  $C_4$ . Sin embargo, los menores descensos de los parámetros de biomasa (LA, SA y TDW) en relación con su control en *A. donax* L. que en *P. Virgatum* L. (Table 4.2.1), incluso con una tasa fotosintética mucho menor, podrían indicar una cierta tolerancia a la salinidad por parte de *A. donax* L. (Lewandowski y col., 2003; Quinn y col., 2015). Cabe destacar que el nivel de estrés salino aplicado a ambas especies ( $16\text{mS cm}^{-1}$ ) ha sido considerado como “severo” en otros cultivos, como por ejemplo el trigo (Yousfi y col., 2009), y que también han sido utilizado en otros estudios con *A. donax* L. y residuos salinos (Williams y col., 2008; Calheiros y col., 2012). Según Calheiros y col. (2012), *A. donax* L. presentó resistencia a la alta salinidad presente en las aguas residuales, llegando incluso a ser descrita como especie halofita (Williams y col., 2010).

En relación a *P. Virgatum* L., ésta ha sido clasificada como una especie con tolerancia moderada a la salinidad (Quinn y col., 2015). Al igual que ocurría en el estrés hídrico (Exp. II), la mayor reducción de la biomasa (LA, SA y TDW) de *P. Virgatum* L. presentando una mayor tasa fotosintética (Fig. 4.2.1, Table 4.2.), indicaría un cierto mecanismo de la planta para disminuir la pérdida de agua y con ello, los daños producidos por el estrés salino (Chaves y col., 2009).

### **5.2.3.- Respuesta a la combinación de estrés salino y estrés hídrico**

En la naturaleza es muy común que un estrés este acompañado de otro o varios factores estresantes, lo que se define como “multiplicidad de estreses” (Schulze y col., 2005). A veces, la exposición de la planta a un estrés provoca que la planta genere vulnerabilidad a otros estreses, haciendo que el metabolismo de la planta se vea afectado de manera considerablemente (Schulze y col., 2005).

Según los resultados obtenidos, la combinación de ambos estreses provocó, al igual que los estreses por separado, la disminución de  $A_{\text{sat}}$  y de  $g_s$  de *A. donax* L. (Fig. 4.1.1 y Fig. 4.2.1) y de *P. virgatum* L. (Fig. 4.2.1). En *A. donax* L., el hecho de no encontrarse diferencias significativas al finalizar el experimento entre los tres tratamientos supondría que la interacción de los estreses (salino e hídrico) no aumentó el impacto del estrés sobre la planta. Sin embargo, si que se encontraron diferencias entre los estreses en los

estadios anteriores, por lo que podemos concluir que uno de los factores más críticos sobre el efecto del estrés en las plantas es la duración del estrés. Por otro lado, hemos observado cómo *P. virgatum* L. ha sido muy afectado por la combinación de ambos estreses de acuerdo a los bajos valores de  $A_{\text{sat}}$  y  $g_s$  al concluir el experimento (Fig. 4.2.1), generando una mayor disminución en los parámetros de biomasa en esta especie que en *A. donax* L. (Table 4.2.1).

Al estudiar el comportamiento de los tres tratamientos (estrés salino, estrés hídrico y la combinación de ambos) sobre parámetros como el RWC (Fig. 4.1.2 y Fig. 4.2.2), el contenido de clorofilas (SM 1.2 y SM 2.3) y los distintos parámetros de biomasa (Fig. 4.1.3, Table 4.1.1, Table 4.1.2 y Table 4.2.1) observamos cómo *A. donax* L. está más afectado por el estrés hídrico que por la salinidad.

#### **5.2.4.- Uso de índices de susceptibilidad al estrés**

En esta sección abordaremos el uso de índices de susceptibilidad al estrés como herramienta clasificatoria de genotipos de acuerdo a su tolerancia (o sensibilidad) a un determinado tipo de estrés.

En el experimento I estudiamos el efecto de la salinidad, el estrés hídrico y ambos estreses sobre varios clones de *A. donax* L. Cabe mencionar que el cultivo de cultivos energéticos, como es *A. donax* L., en tierras agrícolas ha traído consigo una preocupación sobre el cambio de uso de la tierra. Por ello, uno de los objetivos del experimento I, fue clasificar los distintos clones de *A. donax* L. estudiados en función de su tolerancia o sensibilidad a dos de los estreses que ocurren con mayor frecuencia en la zona Mediterránea: el estrés hídrico y el estrés salino, así como la combinación de ambos. Con esta finalidad se usó el Índice de Susceptibilidad al Estrés (“*Stress Susceptibility Index*”, SSI; Naghavi y col., 2013).

De acuerdo a los resultados del experimento Ia, Agrigento parece ser el clon más adecuado para su crecimiento en las áreas Mediterráneas bajo condiciones de estrés hídrico, debido a su menor disminución en  $A_{\text{sat}}$  (Fig. 4.1.1), en su RWC (Fig. 4.1.2) y en su  $g_{\text{LA}}$  (Table 4.1.1), lo que le confirió el menor valor del índice SSI (Fig. 4.1.6).

Por otro lado, Martinensis parece ser el clon más tolerante a la salinidad en el experimento I, haciéndolo adecuado para su cultivo en tierras marginales donde predomine este factor estresante. Al igual que Agrigento, su ligera disminución en  $A_{\text{sat}}$  (Fig. 4.1.1) y  $g_{\text{LA}}$  (Table 4.1.1) le otorgó el menor valor de SSI contra salinidad (Fig. 4.1.6), seguido de Cefalú y Fondachello. En relación a ambos estreses y basándonos en los resultados obtenidos, proponemos Martinensis y Piccoplant como aquellos clones más adecuados para crecer en condiciones donde se desarrollen ambos estreses simultáneamente, ya que fueron los clones con mejor rendimiento constante en la producción de biomasa.

Según los resultados del experimento Ib, en el cual se ha calculado el SSI para cinco clones de *A. donax* L. en condiciones de incremento del nivel de salinidad, Fondachello parece ser el clon más tolerante a los niveles creciente de salinidad, seguido por Cefalú y Licata, confirmando la baja tolerancia a la salinidad de Agrigento y Tortorici (SM 1.6).

### 5.2.5.- Respuesta al estrés por baja temperatura y oscuridad continua

En este punto discutiremos las respuestas fisiológicas de estas dos especies de gramíneas perennes al estrés por baja temperatura y oscuridad continua, basadas en los resultados del experimento II.

Björkman (1981) y Lambers y col. (1998) describieron el efecto de las bajas temperaturas como un crioprotector de las enzimas. Los resultados obtenidos han demostrado cómo las bajas temperaturas y oscuridad han causado menos reducción de los parámetros fotosintéticos que la temperatura ambiente y oscuridad, siendo por tanto, consistente con lo estudiado por los autores anteriores. Sin embargo, el comportamiento de ambas especies bajo condiciones de baja temperatura y oscuridad no ha sido similar, ya que los menores descensos de  $A_{\text{sat}}$  en *P. Virgatum* L. que en *A. donax* L. indicaría diferencias en la tolerancia al frío de ambas especies, siendo más tolerante *P. Virgatum* L. (Table 4.2.2). En este sentido, Pompeiano y col. (2015) mostró cómo la temperatura letal a la cual moría el 50% de dos distintos clones de *A. donax* L. ( $LT_{50}$ ) se situaba entre  $-16,4$  y  $-12,8^{\circ}\text{C}$ , mientras que Hope y McElroy (1990) fijó la tolerancia de *P. Virgatum* L. entre  $-19$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ .

En las especies  $C_3$ , la relación entre  $A_{\text{sat}}$  y la máxima velocidad de carboxilación de la rubisco ( $V_{c,\text{max}}$ ) tiende a ser proporcional (Sage, 2001). Los daños irreversibles a partir de 6 días en CD (no hay recuperación completa de  $V_{c,\text{max}}$ ; Table 4.2.2) indicaría que el contenido o la activación de la Rubisco han sido afectados. Esta observación concordaría con Sage y McKnown (2006), quienes aseguran que el contenido o la actividad de la Rubisco se han visto reducidos en muchas especies  $C_3$  hasta un 55% respecto al control en condiciones de baja intensidad lumínica. Por lo tanto, las bajas temperaturas, además de funcionar como un crioprotector de enzimas, podría actuar retardando ligeramente el efecto degradativo de la oscuridad.

La disminución de  $J_{\text{max}}$  por la oscuridad en *A. donax* L. es independiente de la temperatura y no está relacionada con  $V_{c,\text{max}}$  (Harrison y col., 2001) mientras que en *P. Virgatum* L. si que se ha observado esa correlación entre ambos parámetros, de acuerdo a Hudson y col. (1992) y Price y col. (1995) (Table 4.2.2).

En relación a *P. Virgatum* L., cabe destacar que aunque la vía metabólica  $C_4$  ha sido comúnmente asociada a plantas de climas cálidos o tropicales (Caldwell y col., 1977; Long, 1983; Ghannoum, 2009) diversos estudios han observado cierta tolerancia al frío en determinadas especies  $C_4$  (Caldwell y col., 1977) y en particular en *P. virgatum* L. (Hope y McElroy, 1990), coincidiendo con los resultados que hemos obtenido. De acuerdo con Gutierrez y col. (1974) y Hatch y Osmond (1976), parece ser que, dentro de las especies  $C_4$ , las más sensibles al frío pertenecen al grupo de las NADP-ME, y que el efecto de las bajas temperaturas traería consigo cambios en las cinéticas de asimilación del  $\text{CO}_2$  y en la ultraestructura y las propiedades de los cloroplastos (Taylor y Craig, 1971; Brooking y Taylor, 1973). Por el contrario, las especies  $C_4$  del tipo NAD-ME, como por ejemplo *P. Virgatum* L. o *Atriplex*, serían más tolerantes al frío (Gutierrez y col., 1974). Caldwell y col., (1977) demostraron cómo las bajas temperaturas modificaron las cinéticas de la asimilación del C incluso en las especies  $C_4$  tolerantes al frío, pero sin afectar al metabolismo de la manera que se observa en las especies  $C_4$  sensibles al frío.

La recuperación completa de la maquinaria de fijación del carbono a los 9 días en CD (Table 4.2.2), implicaría que las enzimas características de la vía  $C_4$ , como son la PEPC y la enzima piruvato fosfato diquinasa (PPDK, "*Pyruvate Phosphate DiKinase*" en inglés) no han sido dañadas o no han visto reducida su cantidad, tal y como demuestra Sage y McKnown (2006) en especies  $C_4$  tolerantes al frío. Chinthapalli y col. (2002) describieron cómo la tolerancia a las bajas temperaturas se debe al amplio rango de cambios conformacionales que afectan a la enzima PEPC (que se disocia de su forma tetramérica normal a una forma dimérica, menor activa pero igualmente funcional) así como al incremento de la expresión de la enzima PPDK.

En relación a la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (PSII) en *A. donax* L. (Table 4.2.3), se ha observado una disminución de los valores  $F_v/F_m$ , de  $F'_v/F'_m$ , de  $\Phi_{PSII}$  así como de  $q_p$  en en ambos tratamientos, siendo más afectada por la temperatura ambiente. Además, el hecho de que la reducción de estos parámetros en condiciones de temperatura ambiente se haya producido antes que en condiciones de baja temperatura indicaría que la baja temperatura reduciría el efecto fotoinhibitorio de la oscuridad, según Murata y col. (2007).

Las similares tasas de respiración en ambas especies indica que no existen diferencias entre las especies  $C_3$  y  $C_4$  (Byrd y col., 1992), aunque se vieron mucho más afectadas por la temperatura ambiente que por la baja temperatura (Table 4.2.4). De acuerdo con Tcherkez y col. (2003), la temperatura afecta directamente a la respiración, es decir, el aumento de la temperatura aumenta la velocidad de consumo de las reservas. Este hecho se correlaciona también con la producción de  $CO_2$ , donde los valores más bajos se encuentran en el tratamiento de temperatura ambiente y oscuridad continua (Table 4.2.4), debido, presumiblemente, al bajo contenido de reservas en la planta.

Una de las consecuencias de la ausencia de luz, es que, al no haber fijación de carbono, las demandas energéticas deben satisfacerse a partir del consumo de reservas de C. Por lo tanto, la oscuridad continua induce a una gestión importante de los recursos de las plantas, priorizando el consumo de los recursos más energéticos, tal y como indica Byrd y

col. (1992). El almidón es el producto consumido principalmente al inicio del periodo de oscuridad, y una vez consumido éste se consumen las proteínas para finalizar con los lípidos (Tcherkez y col., 2003).

El cociente respiratorio (RQ, "*Respiratory Quotient*", en inglés = Producción de CO<sub>2</sub> / Consumo de O<sub>2</sub>) nos da información sobre el tipo de sustrato que está siendo utilizado por el metabolismo respiratorio (Tcherkez y col., 2003). Según este autor, un RQ cercano a 1 indica que el principal sustrato de la respiración son los carbohidratos, mientras que cuando el sustrato de la respiración lo componen otros compuestos menos oxigenados (como las proteínas o los lípidos) se observa una disminución en el RQ, que llega a valores de 0,8 – 0,6. Los valores superiores a 1 indican que los ácidos orgánicos son utilizados en el proceso respiratorio. Por tanto, los resultados indican que en condiciones control, son los ácidos orgánicos y los carbohidratos los principales sustratos consumidos en ambas especies, mientras que en condiciones de estrés los sustratos consumidos varían. El RQ de *A. donax* L. en condiciones CD indica el consumo de azúcares y proteínas, mientras que en AD los valores de RQ disminuyen, consumiéndose principalmente lípidos (Table 4.2.4). En el caso de *P. Virgatum* L., los sustratos consumidos en ambos tratamientos son similares, principalmente azúcares y proteínas (Table 4.2.4). Las bajas temperaturas han ralentizado el metabolismo, con menores requerimientos de energía, y, por tanto, menor consumo de reservas, de acuerdo a lo expresado por Tcherkez y col. (2003) y Nogués y col. (2004). El mayor RQ en *P. Virgatum* L. en condiciones de baja temperatura indicaría un metabolismo más lento como consecuencia de la tolerancia al frío, y, por tanto, un mayor contenido en carbohidratos (Lewandowski y col., 2003), principalmente en tallos y rizoma.

### **5.3.- Resultados del uso de isótopos estables en ecofisiología**

En este apartado se pretende resumir los resultados derivados de la Tesis en donde se caracterizaron y estudiaron los cambios en los isótopos estables de <sup>13</sup>C y <sup>15</sup>N en ambas especies de gramíneas perennes sometidas a tres niveles de estrés hídrico (Exp. III).



en los valores de  $\delta^{13}\text{C}_R$  en ambas especies antes del marcaje (T0), que vendría explicado por las diferencias en las rutas metabólicas.

Además, según Ghashghaie y col. (2003) y Badeck y col. (2005), la composición isotópica de la planta varía en función de los órganos, es decir, existe un fraccionamiento isotópico entre los órganos debido a procesos de discriminación durante la fotosíntesis, durante el transporte de los asimilados y durante la respiración en la oscuridad. Este proceso se denomina discriminación post-fotosíntesis. Sin embargo, los resultados no han mostrado diferencias significativas en la composición isotópica de la materia orgánica ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$ ) entre órganos, en ninguna de las dos especies en condiciones control, por tanto, estas plantas no presentan discriminación post-fotosíntesis (Fig. 4.3.5).

En relación a la composición isotópica de los azúcares totales solubles ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{TSS}}$ , Fig. 4.3.6), éstos han sido definidos como los sustratos respiratorios más enriquecidos en  $^{13}\text{C}$  en algunas especies  $\text{C}_3$ , según Ghashghaie y col. (2003) y Nogués y col. (2004). Sin embargo, este mayor enriquecimiento de TSS con respecto a TOM no ha sido observado en ninguna de las dos especies. Por el contrario, se ha observado un enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  en el  $\text{CO}_2$  respirado ( $\delta^{13}\text{C}_R$ ) de entre -5‰ a -10‰ en comparación con los azúcares ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{TSS}}$ ) en *A. donax* L., que entra dentro del rango esperado de otras especies  $\text{C}_3$  (-6‰) según Duranceau y col. (1999) y Nogués y col. (2004), mientras que en *P. virgatum* L. este enriquecimiento de  $\delta^{13}\text{C}_R$  frente a  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TSS}}$  ha sido menor.

El enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  observado en  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$  (Fig. 4.3.5), en  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TSS}}$  (Fig. 4.3.6) y en  $\delta^{13}\text{C}_R$  (Fig. 4.3.7) a las 24 horas de realizar el marcaje isotópico con  $^{13}\text{CO}_2$  (T1) demuestra que las plantas asimilaron el  $^{13}\text{CO}_2$  mediante la fotosíntesis y lo incorporaron a los procesos de translocación, de almacenamiento y de respiración. En este caso, se observaron diferencias significativas entre la composición isotópica de los órganos en ambas especies (Ghashghaie y col., 2003; Badeck y col., 2005). Respecto a los órganos, observamos cómo, tras el marcaje (T1), el tallo es el órgano cuya TOM está más enriquecida en  $^{13}\text{C}$  (en ambas especies para cada tratamiento; Fig. 4.3.5). Esto podría indicar dos cosas, que el transporte de fotoasimilados enriquecidos en  $^{13}\text{C}$  en el

momento de muestreo o que el tallo actuaría como un órgano sumidero (de reserva) de forma temporal. Otro de los órganos con mayor marcaje isotópico es el rizoma, confirmando la hipótesis de que el rizoma actuaría como un órgano sumidero de C permanente (Mann y col., 2013).

El hecho de que los valores de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$  (Fig. 4.3.5), del  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TSS}}$  (Fig. 4.3.6) y del  $\delta^{13}\text{C}_{\text{R}}$  (Fig. 4.3.7) a los siete días tras el marcaje (T2) en condiciones control se mantengan todavía enriquecidos con  $^{13}\text{C}$  sugiere que tanto las hojas como los otros órganos no han perdido todavía todo el  $^{13}\text{C}$  a través de la respiración mitocondrial (Nogués y col., 2004). Es decir, el carbono enriquecido está presente todavía en los órganos de la planta, y para llegar a los valores iniciales (T0) se requiere más tiempo hasta su completo metabolismo.

En general, tallo y rizoma continúan siendo los órganos más enriquecidos en  $^{13}\text{C}$  en T2, indicando por tanto que ambos órganos continúan siendo un importante sumidero permanente de C. Uno de los motivos por los cuales los tallos han podido actuar como órganos de reserva, es que son tejidos fotosintéticamente activos, que fijan  $^{13}\text{C}$  directamente y lo incorporan a sus tejidos. Por tanto, almacenan los fotoasimilados que están marcados con los isótopos estables (Cernusak y col., 2001; Ghashghaie y Badeck, 2014).

### **5.3.1.2.- Isótopos estables de N**

Según Yousfi y col. (2010), el análisis del  $\delta^{15}\text{N}$  puede ser utilizado para reflejar distintos niveles de fertilización nitrogenada y variaciones en la disponibilidad hídrica, así como la transferencia de N entre órganos, plantas y el ecosistema (Tcherkez y Hodges, 2008).

Los valores iniciales (T0) de la composición isotópica del N en la materia orgánica ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{TOM}}$ ; Fig. 4.3.8) de ambas especies se encontraron en los rangos de abundancia natural esperados según Tcherkez y Hodges (2008). Los resultados obtenidos mostraron que los órganos en general más enriquecidos de forma natural con  $^{15}\text{N}$  fueron las hojas y los tallos, indicando que el N se trasloca desde la raíz hacia las hojas, actuando éstas

como sumidero de N. Por el contrario, el rizoma fue claramente el órgano con menor  $\delta^{15}\text{N}_{\text{TOM}}$ .

Tras el marcaje isotópico con  $^{15}\text{N}$  (T1) el  $\delta^{15}\text{N}_{\text{TOM}}$  aumentó considerablemente (Fig. 4.3.8), indicando que el  $^{15}\text{N}$  fue absorbido e incorporado al metabolismo por las raíces, siendo posteriormente traslocado hacia los distintos órganos. Los mayores valores de  $\delta^{15}\text{N}_{\text{TOM}}$  observados en *A. donax* L. que en *P. virgatum* L. tras el marcaje (T1) confirmaría la mayor necesidad de N en las especies  $\text{C}_3$  que en las  $\text{C}_4$ , ya que, según Sage y col. (1987), las especies con mayor demanda de N discriminarían menos contra el  $^{15}\text{N}$ . El hecho de que las hojas sean los órganos con menor  $\delta^{15}\text{N}_{\text{TOM}}$  indicaría una lenta translocación del N desde las raíces hacia las hojas.

Al igual que ocurría con el  $^{13}\text{C}$ , todos los órganos de la planta (incluso en condiciones de estrés) todavía se encontraron enriquecidos con  $^{15}\text{N}$  a los siete días tras el marcaje (T2). El hecho de que los valores de  $^{15}\text{N}$  sean muy elevados con respecto a los valores de abundancia natural (Fig. 4.3.8) indicaría un lento metabolismo del N. El aumento de  $\delta^{15}\text{N}_{\text{TOM}}$  de la hojas entre T1 y T2 (5% y 64% en *A. donax* L. y en *P. virgatum* L., respectivamente) mostraría la continuidad de la translocación del  $^{15}\text{N}$  desde las raíces.

### 5.3.2.- Uso de isótopos estables como medidores de estrés

Según los resultados de esta Tesis, se observó un enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  en TOM, en TSS y en la respiración en oscuridad debido al estrés hídrico (Fig. 4.3.5, Fig. 4.3.6 y Fig. 4.3.7, respectivamente), tal y como era esperado según los resultados de Farquhar y col. (1989) y Ghashghaie y col. (2003). Este descenso en la discriminación isotópica de la fotosíntesis es consecuencia de los descensos en  $g_s$  (Fig. 4.3.1), y por lo tanto, en la presión parcial intercelular de  $\text{CO}_2(c_i)$ . Cuando  $c_i$  disminuye, el  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  dentro de la hoja se va enriqueciendo progresivamente, por lo que los fotosintetizados también se ven enriquecidos (Marshall y col., 2007). Por lo tanto, en especies  $\text{C}_3$ , se espera una alta correlación entre el  $\delta^{13}\text{C}$  y la eficiencia en el uso del agua (WUE; Cabrera-Bosquet y col., 2007). Sin embargo, como en las plantas  $\text{C}_4$  no hay evidencias de la variación en el balance entre la asimilación enzimática y la difusión a través de los estomas, la  $\delta^{13}\text{C}$  no

puede ser interpretada en términos de la eficiencia en el uso del agua (Marshall y col., 2007) ni de producción de biomasa (Cabrera-Bosquet y col., 2009).

Los resultados obtenidos indican que, en condiciones de premarcaje (T0), el efecto del estrés hídrico ha producido un enriquecimiento en <sup>13</sup>C en todos los órganos de *A. donax* L., mientras que en *P. virgatum* L. no se han obtenido diferencias significativas (Fig. 4.3.5, Fig. 4.3.6 y Fig. 4.3.7). Sin embargo, tras el marcaje isotópico (T1, T2) se ha observado una tendencia general al enriquecimiento en <sup>13</sup>C, tanto de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$ , de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TSS}}$  como de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{R}}$ , en todos los órganos de ambas especies bajo condiciones de estrés hídrico, aumentando el enriquecimiento en <sup>13</sup>C conforme aumentaba el grado de estrés hídrico (Fig. 4.3.5, Fig. 4.3.6 y Fig. 4.3.7). En este caso, la tendencia es mucho más clara en *P. virgatum* L. que en *A. donax* L. Según Hobbie y Werner (2004), el estrés hídrico alteraría los patrones isotópicos debido a un fraccionamiento isotópico adicional durante la fotorrespiración, creando cambios en los flujos del carbono en la conversión de las triosas a glucosa.

En relación al <sup>15</sup>N (Fig. 4.3.8), la reducción de  $\delta^{15}\text{N}_{\text{TOM}}$  en ambas especies como consecuencia del estrés hídrico era esperada de acuerdo a lo expresado por Robinson y col. (2000) y Yousfi y col. (2010). De acuerdo a Farquhar y col. (1989), la disminución de la  $g_s$  como consecuencia del estrés conduciría a la reducción de las pérdidas de amonio y de óxido nitroso, disminuyendo  $\delta^{15}\text{N}$ . Mariotti y col. (1982) sugirió que una alta concentración de N externa en relación a una demanda de N modesta inducida por el estrés daría lugar a una discriminación contra el <sup>15</sup>N, disminuyendo el  $\delta^{15}\text{N}$ . Además, para Handley y col. (1997), el motivo de la disminución del  $\delta^{15}\text{N}$  debido al estrés sería la regulación a la baja de la enzima asimiladora, la nitrato reductasa (NR).

Para finalizar este punto podemos concluir cómo los resultados de esta Tesis han demostrado que los isótopos estables proporcionan una visión única de los procesos fisiológicos y de las interacciones entre las plantas y el medio ambiente, tal y como concluye Cernusak y col. (2013).



## **CONCLUSIONES**



- 1.- El mecanismo de concentración de CO<sub>2</sub> de *P. virgatum* L. (C<sub>4</sub>) supuso una mejora en los parámetros fotosintéticos aunque no se vio reflejado en una mayor tasa fotosintética ( $A_{sat}$ ), ya que *A. donax* L. ha sido catalogada como una especie C<sub>3</sub> con un alto potencial fotosintético, similar al de una C<sub>4</sub>.
- 2.- El mecanismo de concentración de CO<sub>2</sub> de *P. virgatum* L. (C<sub>4</sub>) supuso una mayor producción de biomasa en condiciones control.
- 3.- *A. donax* L. está más empobrecida en <sup>13</sup>C que *P. virgatum* L. en condiciones control, como consecuencia de las diferencias en la vía metabólica del C.
- 4.- En condiciones de estrés, tanto hídrico como salino, el descenso de la tasa fotosintética ( $A_{sat}$ ) ha ido íntimamente ligado a la disminución de la conductancia estomática ( $g_s$ ). A su vez, ambos tipos de estreses han supuesto una disminución de la producción de biomasa.
- 5.- La elevada tasa fotosintética encontrada en *P. Virgatum* L. en comparación con *A. donax* L. tras dos meses de estrés hídrico y salino en condiciones controladas indicaría una cierta tolerancia de esta especie a los dos tipos de estreses. A su vez, *P. Virgatum* L. presentó mayor tolerancia a las bajas temperaturas que *A. donax* L. .
- 6.- La mayor disminución de los parámetros de biomasa en *A. donax* L. en los tratamientos relativos a estrés hídrico indicaría un mayor efecto de este estrés que de la salinidad.
- 7.- El efecto de la interacción de estreses salino e hídrico no ha afectado de igual manera a las especies estudiadas: la tasa fotosintética de *P. virgatum* L. ha sido ampliamente afectada por la interacción de estreses mientras que en *A. donax* L. el efecto es similar al de los estreses por separado.
- 8.- En función de los resultados obtenidos, proponemos Martinensis y Piccoplant como aquellos clones de *A. donax* L. más adecuados para crecer en condiciones donde se desarrollen ambos estreses simultáneamente, ya que son los clones con mejor rendimiento constante en la producción de biomasa.

9.- Las bajas temperaturas, además de funcionar como un crioprotector de enzimas, actuarían retardando ligeramente el efecto negativo de la oscuridad.

10.- El mayor RQ en *P. Virgatum* L. que en *A. donax* L. en condiciones de baja temperatura indicaría un metabolismo más lento como consecuencia de la tolerancia al frío, y, por tanto, un mayor contenido en azúcares.

11.- El importante enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  del tallo y el rizoma de estas especies indicaría que ambos órganos funcionarían como sumideros de carbono.

12.- El marcaje isotópico con  $^{15}\text{N}$  muestra cómo el nitrógeno se trasloca desde la raíz hacia las hojas, actuando éstas como un órgano sumidero de nitrógeno.

## **REFERENCIAS**



- Abbot P. (2013) Biofuels, binding constraints and agricultural commodity prices volatility. NBER Working paper (873).
- Albaugh J., Domec J., Maier C., Sucre E., Legget Z. & King J. (2014) Gas exchange and stand-level estimates of water use and gross primary productivity in an experimental pine and switchgrass intercrop forestry system on the Lowel Costal Plain of North Carolina, USA. *Agricultural and Forest Meteorology*, 192-193, 27-40.
- Alexopoulou E., Sharma N., Papatheohari Y., Christou M., Piscioneri I., Panoutsou C. & Pignatelli V. (2008) Biomass yield for upland and lowland switchgrass varieties grown in the Mediterranean region. *Biomass and Bioenergy*, 32 (10), 926-933.
- Allen D. & Ort D. (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science*, 6, 36-42.
- Angelini G., Ceccarini L. & Bonari E. (2005) Biomass yield and energy balance of giant reed (*Arundo donax* L.) cropped in central Italy as related to different management practices. *European Journal of Agronomy*, 22 (4), 375-389.
- Angelini G., Ceccarini L., Nassi o Di Nasso N. & Bonari E. (2009) Comparison of *Arundo donax* L. and *Miscanthus x giganteus* in a long-term field experiment in Central Italy: Analysis of productive characteristics and energy balance. *Biomass and Bioenergy*, 33 (4), 129-141.
- Araus J., Slafer G., Reynolds M. & Royo C. (2002) Plant breeding and water relations in C<sub>3</sub> cereals: what should we breed for? *Annals of Botany*, 89, 925-940.
- Armstrong A., Johns C. & Tubby I. (1999) Effect of spacing and cutting cycle on the grown as an energy crop. *Biomass and Bioenergy*, 17, 305-314.
- Ashraf M. & Harris PJC. (2013) Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica*, 51, 163-190.
- Azcón-Bieto J. & Talón M. (2008) Fundamentos de Fisiología Vegetal. Capítulo 29: Fisiología de las plantas y el estrés. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill.
- Badeck FW., Tcherkez G., Nogués S., Piel C. & Gashghaie J. (2005) Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs – a widespread phenomenon. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 19,1381-1391.
- Baffes J. & Haniotis T. (2010) Placing the 2006/08 commodity price boom into perspective. Policy Research Working Paper 5371, The World Bank.
- Balogh E., Herr J., Czakó M. & Márton L. (2012) Defective development of male and female gametophytes in *Arundo donax* L. (Poaceae). *Biomass and Bioenergy*, 45, 265-269.
- Barney J. & DiTomaso J. (2008) Nonnative Species and Bioenergy: Are we cultivating the next invader? *Bio Science*, 58, 64-70.

- Barney J., Mann J., Kyser G., Blumwald E., Van Deynze A. & DiTomaso J. (2009) Tolerance of switchgrass to extreme soil moisture stress: Ecological implications. *Plant Science*, 177, 724-732.
- Battisti D. & Naylor R. (2009) Historical Warnings of Future Food Insecurity with Unprecedented Seasonal Heat. *Science* (323), 240-244.
- Beale C., Morison J. & Long S. (1999) Water use efficiency of C<sub>4</sub> perennial grasses in a temperate climate. *Agricultural Forest Meteorology*, 96, 103-115.
- Bernacchi C.J., Portis A.R., Nakano H., von Caemmerer S. & Long S.P. (2002) Temperature response of mesophyll conductance. Implications for the determination of Rubisco enzyme kinetics and for limitations to photosynthesis in vivo. *Plant Physiology*, 130, 1992-1998.
- Berry J. (1989) Studies of mechanisms affecting the fractionation of carbon isotopes in photosynthesis. In P. Rundel, J. Ehleringer & K. Nagy, *Stable Isotopes in Ecological Research* (pages. 82-94). New York: Springer-Verlag.
- Björkman O. (1981) Responses to different quantum flux densities. In O. Lange, P. Nobel, C. Osmond & H. Ziegler, *Physiological plant ecology. I Responses to the physical environment* (pages 57-107). Berlin: Springer-Verlag.
- Blum A. (2005) Drought resistance, water-use efficiency and yield potential - are they compatible, dissonant or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research*, 56, 1159-1168.
- Boutton T. (1991) Stable carbon isotope ratios of natural materials: I. Sample preparation and mass spectrometric analysis. In D. Coleman & B. Fry, *Carbon isotope techniques* (pages 155-171). San Diego: Academic Press.
- Brooking I. & Taylor A. (1973) Plants under climatic stress. V. Chilling and light effects on radiocarbon exchange between photosynthetic intermediates of Sorghum. *Plant Physiology*, 52, 180-182.
- Burke E. & Brown S. (2008) Evaluating uncertainties in the projection of future drought. *Journal of Hydrometeorology*, 9, 292-299.
- Byrd G., Sage R. & Brown R. (1992) A comparison of dark respiration between C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Plant Physiology*, 100, 191-198.
- Cabrera-Bosquet L., Molero G., Bort J., Nogués S. & Araus J.L. (2007) The combined effect of constant water deficit and nitrogen supply on WUE, NUE and <sup>13</sup>C in durum wheat potted plants. *Annual of Applied Biology*, 151, 277-289.
- Cabrera-Bosquet L., Sánchez C. & Araus J.L. (2009) How yield relates to ash content,  $\Delta^{13}\text{C}$  and  $\Delta^{18}\text{O}$  in maize grown under different water regimes. *Annals of Botany*, 104, 1207-1216.
- Caldwell M., Osmond C. & Nott D. (1977) C<sub>4</sub> Pathway photosynthesis at low temperature in cold-tolerant *Atriplex* species. *Plant Physiology*, 60, 157-164.

- Calheiros C., Quiteiro P., Silva G., Crispim L., Brix H., Moura S. & Castro PML. (2012) Use of constructed wetland systems with *Arundo* and *Sarcocornia* for polishing high salinity tannery wastewater. *Journal of Environmental Management*, 95, 66-71.
- Carter G. & Knapp A. (2001) Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. *American Journal of Botany*, 88 (4), 677-684.
- Centritto M., Loreto F. & Chartzoulakis K. (2003) The use of low [CO<sub>2</sub>] to estimate diffusional and non-diffusional limitations of photosynthetic capacity of salt-stressed olive saplings. *Plant Cell and Environment*, 26 (4), 585-594.
- Ceotto E., Di Candilo M., Castelli F., Badeck FW., Rizza F., Soave C., Volta A., Villani G. & Marletto V. (2013) Comparing solar interception and use efficiency for the energy crops giant reed (*Arundo donax* L.) and sweet sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Field Crops Research*, 149, 159-166.
- Cernusak L., Marshall, J., Comstock, J. & Balster, N. (2001) Carbon isotope discrimination in photosynthetic bark. *Oecologia*, 128, 24-35.
- Cernusak L., Ubierna N., Winter K., Holtum J., Marshall J. & Farquhar G. (2013) Environmental and physiological determinants of carbon isotope discrimination in terrestrial plants. *New Phytologist*, 200, 950-965.
- Chaves M., Flexas J. & Pinheiro C. (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103, 551-560.
- Chinthapalli B., Murmu J. & Raghavendra A. (2002) Dramatic difference in the responses of phosphoenolpyruvate carboxylase to temperature in leaves of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Journal of Experimental Botany*, 54, 707-714.
- Cheng Y., Zhou W., Gao C., Lan K., Gao Y. & Wu Q. (2009) Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.) tuber by heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *Chemical Technology and Biotechnology*, 84, 777-781.
- Christian D., Riche A. & Yates N. (1997) Nutrient requirement and cycling in energy crops. In N. El Bassam, R. Behl & B. Prochnow, Sustainable agriculture for food, energy and industry (pages 799-804). London: James & James.
- Chutia J. & Borah S. (2012) Water stress effects on leaf growth and chlorophyll content but not the grain yield in traditional rice (*Oryza sativa* Linn.) genotypes of Assam, India II. Protein and proline status in seedlings under PEG induced water stress. *American Journal of Plant Sciences*, 3, 971-980.
- Cornic G., Ghashghaie J., Genty B. & Briantais JM (1992) Leaf photosynthesis is resistant to mild drought stress. *Photosynthetica*, 27, 295-309.
- Cornic G. & Massacci A. (1996) Leaf photosynthesis under drought stress. In N. Baker, Photosynthesis and the environment (pages 347-366). Dordrech: Kluwer Academic.

- Cornic, G. (2000) Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture-not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Sciences*, 5, 187-188.
- Cortese L., Honig J., Miller C. & Bonos S. (2010) Genetic diversity of twelve switchgrass populations using molecular and morphological markers. *Bioenergy Research*, 3, 262-271.
- Cosentino S., Copani V., D'Agosta GM., Sanzone E. & Mantineo M. (2006) First results on evaluation of *Arundo donax* L. clones collected in Southern Italy. *Industrial Crop Production*, 23, 212-222.
- Cosentino S., Scordia D., Sanzone E., Testa G. & Copani V. (2014) Response of giant reed (*Arundo donax* L.) to nitrogen fertilization and soil water availability in semi-arid Mediterranean environment. *European Journal of Agronomy*, 60, 22-32.
- Craig H. (1954) Carbon 13 in plants and relationship between carbon 13 and carbon 14 in nature. *Journal of Geology*, 62, 115-149.
- Dai A. (2011) Drought under global warming: A review. *WIREs Climate Change* 2, 45-65.
- Dawson TE. & Brooks PD. (2001) Fundamentals of stable isotope chemistry and measurement. In Unkovich M., Pate J., McNeill A., Gibbs DJ (eds.) *Stable isotope techniques in the study of biological processes and functioning ecosystems* (pages 1-18). The Netherlands: Kluwer Academic.
- Dawson T., Mambelli S., Plamboeck A., Templer P. & Tu K. (2002) Stable isotopes in plant ecology. *Annual Reviews in Ecology and Systematic*, 33, 507-527.
- de Vries S., van de Ven G., van Itters M. & Giller K. (2010) Resource use efficiency and environmental performance of nine major biofuel crops, processed by first-generation conversion techniques. *Biomass and Bioenergy*, 34, 588-601.
- Duranceau M., Ghashghaie J., Badeck F., Deleens E. & Cornic G. (1999)  $\delta^{13}\text{C}$  of  $\text{CO}_2$  respired in the dark in relation to  $\delta^{13}\text{C}$  of leaf carbohydrates in *Phaseolus vulgaris* L. under progressive drought. *Plant, Cell and Environment*, 22, 515-523.
- Edwards G. & Walker D. (1983)  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$ : mechanisms, and cellular and environmental regulation of photosynthesis. Oxford: Blackwell Scientific.
- Erice G., Louahlia S., Irigoyen J., Sánchez-Díaz M. & Avice J. (2010) Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequently recovery. *Journal of Plant Physiology*, 167 (2), 114-120.
- Escalona J., Flexas J. & Medrano H. (1999) Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26, 421-433.
- European Environmental Agency. Environmental terminology and discovery service (ETDS).

- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013) *FAO Statistical Yearbook 2012: World food and agriculture*. Rome: FAO.
- Fagnano M., Impagliazzo A., Mori M. & Fiorentino N. (2015) Agronomic and environmental impacts of Giant Reed (*Arundo donax* L.): Results from a long-term field experiment in hilly areas subject to soil erosion. *Bioenergy Research*, 8, 415-422.
- Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D. & Basra SMA. (2009) Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management. In E. Lichtfouse, M. Navarrete, P. Debaeke, S. Veronique & C. Alberola, *Sustainable agriculture* (pages 153-188). Netherlands: Springer.
- Farquhar G., O'Leary M. & Berry J. (1982) On the relationship between isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, 9, 121-137.
- Farquhar G. (1983) On the nature of carbon isotope discrimination of leaf water in the non-steady state. *Functional of Plant Physiology*, 10, 205-226.
- Farquhar G. & Richards R. (1984) Isotope composition of plant carbon correlates with water use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology*, 11, 539-552.
- Farquhar G., Hubick K., Condon A. & Richards R. (1989) Carbon isotope fractionation and plant water use efficiency. In P. Rundel, J. Ehleringer & K. Nagy, *Stable isotopes in ecological research* (pages 21-40). New York: Springer-Verlag.
- Farquhar G., Ehleringer J. & Hubick K. (1989b) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review Plant Physiology Molecular Biology*, 40, 503-537.
- Fernández J. & Curt M. (2004) State-of-the-art of *Cynara Cardunculus* as an energy crop. *Proceedings of the 2nd World Conference on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection*, 22-27.
- Fernández J., Curt M. & Aguado P. (2006) Industrial applications of *Cynara cardunculus* L. for energy and other uses. *Industrial Crops and Products*, 24, 222-229.
- Fischer RA. & Maurer R. (1978) Drought resistance in spring wheat cultivars. Grain yield responses. *Australian Journal of Agricultural Research*, 28, 897-912.
- Flexas J. & Medrano H. (2002) Drought-inhibition of photosynthesis in C<sub>3</sub> plants: Stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany*, 89, 183-189.
- Flexas J., Bota J., Loreto F., Cornic G. & Sharkey T. (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C<sub>3</sub> plants. *Plant Biology*, 6, 269-279.
- Ghannoum O., von Caemmerer S. & Conroy J. (2002) The effect of drought on plant water use efficiency of nine NAD-ME and nine NADP-ME Australian C<sub>4</sub> grasses. *Functional Plant Biology*, 29, 1337-1348.
- Ghannoum O. (2009) C<sub>4</sub> photosynthesis and water stress. *Annual Botany*, 103, 635-644.

- Ghannoum O., Evans J. & von Caemmerer S. (2011) Nitrogen and water use efficiency of C<sub>4</sub> plants. In A. Raghavendra & R. Sage, C<sub>4</sub> photosynthesis and related CO<sub>2</sub> concentrating mechanism (pages 129-146). Dordrecht: Springer.
- Ghashghaie J., Duranceau M., Badeck F., Cornic G., Adeline M. & Deleens E. (2001) δ<sup>13</sup>C of CO<sub>2</sub> respired in the dark in relation to leaf metabolites: comparisons between *Nicotiana sylvestris* and *Helianthus annuus* under drought. *Plant, Cell and Environment*, 24, 505-515.
- Ghashghaie J., Badeck F., Lanigan G., Nogués S., Tcherkez G., Deléens E., Cornic G. & Griffiths H. (2003) Carbon isotope fractionation during dark respiration and photorespiration in C<sub>3</sub> plants. *Phytochemistry Review*, 2, 145-161.
- Ghashghaie J. & Badeck F. (2014) Opposite carbon isotope discrimination during dark respiration in leaves versus roots - a review. *New Phytologist*, 201, 751-769.
- Gilbert C. & Mugera H. (2014) Food commodity prices volatility: the role of biofuels. *Natural Resources*, 5, 200-212.
- Gobierno de España (2010) Ministerio de Industria, Energía y Turismo. PANER 2011-2020. Recuperado el 27 de 11 de 2014 de [http://www.minetur.gob.es/energia/desarrollo/EnergiaRenovable/Documents/20100630\\_PANER\\_Espanaversion\\_final.pdf](http://www.minetur.gob.es/energia/desarrollo/EnergiaRenovable/Documents/20100630_PANER_Espanaversion_final.pdf)
- Gobierno de España (2014a) Ministerio de Industria, Energía y Turismo. Recuperado el 25 de Noviembre de 2014, de <http://www.minetur.gob.es/energia/desarrollo/EnergiaRenovable/Paginas/Renovables.aspx>
- Gobierno de España (2014b) Ministerio de Industria, Energía y Turismo. La energía en España 2013. Madrid.
- Gulías J., Flexas J., Abadía A. & Medrano H. (2002) Photosynthetic responses to water deficit in six Mediterranean sclerophyll species: possible factors explaining the declining distribution of *Rhamnus ludovici-salvatoris*, an endemic Balearic species. *Tree Physiology*, 22, 687-697.
- Gutiérrez M., Gracen V. & Edwards G. (1974) Biochemical and cytological relationships in C<sub>4</sub> plants. *Planta*, 119, 279-280.
- Handley L., Robinson D., Forster B., Ellis R., Scrimgeour C., Gordon D., Nevo E., Raven JA. (1997) Shoot δ<sup>15</sup>N correlates with genotype and salt stress in barley. *Planta*, 201, 100-102.
- Hatch M. & Osmond C. (1976) Compartmentation and transport in C<sub>4</sub> photosynthesis. In C. Stocking & U. Heber, *Encyclopedia of Plant Physiology III* (pages 144-184). Berlin: Springer-Verlag.
- Hatch M. (1987) C<sub>4</sub> photosynthesis; a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochemical Biophysica Acta*, 895, 81-106.

- Harrison E., Olcer H., Lloyd J., Long S. & Raines C. (2001) Small decreases in SBPase cause a linear decline in the apparent RuBP regeneration rate, but do not affect Rubisco carboxylation capacity. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1779-1784.
- Heaton E., Voigt T. & Long S. (2004) A quantitative review comparing the yields of two candidate C<sub>4</sub> perennial biomass crops in relation to nitrogen, temperature and water. *Biomass and Bioenergy*, 27, 21-30.
- HLPE (2013) Biofuels and food security. A report by the High Level Panel of Experts on Food Security and Nutrition of the Committee on World Food Security. Rome: FAO.
- Hoagland DR., Arnon DJ. (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experimental Station, Circular*, 347, 1-32.
- Hobbie EA. & Werner RA. (2004) Intramolecular, compound-specific, and bulk carbon isotope patterns in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants: a review and synthesis. *New Phytologist*, 161,371-385.
- Hope H. & McElroy A. (1990) Low-temperature tolerance of switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Canadian Journal of Plant Science*, 70, 1091-1096.
- Hudson G., Evans J., von Cernmerer S., Arvidsson Y. & Andrews T. (1992) Reduction of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase oxygenase content by antisense RNA reduces photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology*, 98, 294-302.
- International Energy Agency (2010) Sustainable production of second-generation biofuels: Potential and perspectives in major economies and developing countries. Paris Cedex: OECD/IEA.
- IPCC (2007) Summary for Policymakers. In D.Q.S. Solomon (Ed.), *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge and New York, United Kingdom and USA: Cambridge University Press.
- IPCC (2011) Introduction. In W. Moomaw, F. Yamba, M. Kamimoto, L. Maurice, J. Nyboer, K. Urama, y otros, O. Edenhofer, R. Pichs-Madruga, Y. Sokona , K. Seyboth, P. Matschoss, S. Kadner, y otros (Edits.), *Special report on renewable energy sources and Climate Change Mitigation*. Cambridge y New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- IPCC (2013) *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. (T. Stocker & G. P. D. Qin, Edits.) Cambridge and New York, United Kingdom and USA: Cambridge University Press.
- Jagtap V., Bhargava S., Streb P. & Feierabend J. (1998) Comparative effect of water, heat and light stresses on photosynthetic reactions in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Journal of Experimental Botany*, 327 (49), 1715-1721.
- Khudamrongsawat J., Tayyar R. & Holt J. (2004) Genetic diversity of giant reed (*Arundo donax*) in the Santa Ana River, California. *Weed Science*, 52, 395-405.

- Kratsch H. & Wise R. (2000) The ultrastructure of chilling stress. *Plant Cell and Environment*, 23, 337-350.
- Lambers H., Chapin III FS. & Pons TL. (1998) *Plant Physiological Ecology*. New York: Springer-Verlag.
- Lambert AM., Dudley TL. & Robbins J. (2014) Nutrient enrichment and soil conditions drive productivity in the large-saturated invasive grass *Arundo donax*. *Aquatic Botany*, 112, 16-22.
- Lara M. & Andreo C. (2011) C<sub>4</sub> plants adaptation to high levels of CO<sub>2</sub> and to drought environments. In A. Shanker & B. Venkateswarlu. *Abiotic stress in plants - mechanisms and adaptations*. InTech.
- Lawlor D. & Cornic G. (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment*, 25, 275-294.
- Lawlor D. (2002) Limitations to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany*, 89, 871-885.
- Leegood R. (1993) Carbon dioxide concentrating mechanism. In L. R. Lea PJ, *Plant biochemistry and molecular biology*. Chichester, UK: John Wiley and Sons.
- Levitt J. (1980) *Responses of plants to environmental stresses*. New York: Academic Press.
- 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 and Bioenergy*, 25, 335-361.
- Li F., Kang S. & Zhang J. (2004) Interactive effects of elevated CO<sub>2</sub>, nitrogen and drought on leaf area, stomatal conductance and evapotranspiration of wheat. *Agricultural Water Management*, 67, 221-233.
- Liu F. & Stützel H. (2002) Leaf expansion, stomatal conductance and transpiration of vegetable amaranth (*Amaranthus* sp.) in response to soil drying. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127, 878-883.
- Long S., Incoll L. & Woolhouse H. (1975) C<sub>4</sub> photosynthesis in plants from cool temperate regions, with particular reference to *Spartina townsendii*. *Nature*, 275, 622-624.
- Long S. (1983) C<sub>4</sub> photosynthesis at low-temperatures. *Plant, Cell and Environment*, 6, 345-363.
- Ma Z., Wood C. & Bransby D. (1999) Soil management impacts on soil carbon sequestration by switchgrass. *Biomass and Bioenergy*, 18, 469-477.
- Mann J., Barney J., Kyser G. & DiTomaso, J. (2013) *Miscanthus x giganteus* and *Arundo donax* shoot and rhizome tolerance of extreme moisture stress. *Global Change Biology Bioenergy*, 5, 693-700.

- Mariani C., Cabrini R., Danin A., Piffanelli P., Fricano A., Gomarasca S., Dicandilo M., Grassi F. & Soave C. (2010) Origin, diffusion and reproduction of the giant reed (*Arundo donax* L.): a promising weedy energy crop. *Annals of Applied Biology*, 157, 191-202.
- Mariotti A., Mariotti F., Champigny ML., Amarger N. & Moyse A. (1982) Nitrogen isotope fractionation associated with nitrate reductase activity and uptake of nitrate by pearl millet *Pennisetum* spp. *Plant Physiology*, 69, 880-884.
- Maroco JP., Pereira JS. & Chaves M. (2000) Growth, photosynthesis and water-use efficiency of two C4 Sahelian grasses subjected to water deficits. *Journal of Arid Environments*, 45, 119-137.
- Marshall J., Brooks J. & Lajtha K. (2007) Sources of variation in the stable isotopic composition of plants. In R. Michener & K. Lajtha, *Stables isotopes in ecology and environmental science*. Oxford, UK: Blackwell Publishing.
- Massacci A., Nabiev S., Pietrosanti L., Nematov S., Chernikova T., Thor K. & Leipner J. (2008) Response of the photosynthetic apparatus of cotton (*Gossypium hirsutum*) to the onset of drought stress under field conditions studied by gas-exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 189-195.
- Mateo, M., Ferrio J. & Araus, J. (2003) Isótopos estables en fisiología vegetal. In M. Reigosa, N. Pedrol & A. Sanchez, *La ecofisiología vegetal, una ciencia de síntesis* (pages 113-160). Madrid: Paraninfo S.A.
- McLaughlin S. & Walsh M. (1998) Evaluating environmental consequences of producing herbaceous crops for bioenergy. *Biomass and Bioenergy*, 14 (4), 317-324.
- McMurtrie RE. & Wang YP. (1993) Mathematical models of the photosynthetic response of tree stands to rising CO<sub>2</sub> concentrations and temperatures. *Plant, Cell and Environment* 16, 1-13.
- Medrano H., Escalona J., Bota J., Gulías J. & Flexas J. (2002) Regulation of photosynthesis of C<sub>3</sub> plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany*, 89, 895-905.
- Mittelheuser CJ. & van Steveninck RFM. (1969) Stomatal closure and inhibition of transpiration induced by (RS)-abscisic acid. *Nature (London)*, 221, 281-282.
- Munns R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25, 239-250.
- Munns R., Passioura J., Guo J., Chazen O. & Cramer G. (2002) Water relations and leaf expansion: importance of time scale. *Journal of Experimental Botany*, 350, 1495-1504.
- Munns R. (2005) Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, 167, 645-663.
- Munns R., James R. & Läuchli A. (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1025-1043.

- Munns R. & Tester M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.
- Murata N., Takahashi S., Nishiyama Y. & Allakhverdiev S. (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767, 414-421.
- Nackley L., Vogt K. & Kim S. (2014) *Arundo donax* water use and photosynthetic responses to drought and elevated CO<sub>2</sub>. *Agricultural Water Management*, 136, 13-22.
- Naghavi M., Pour Aboughardareh A. & Khalili M. (2013) Evaluation of drought tolerance indices for screening some of corn (*Zea Mays* L.) cultivars under environmental conditions. *Notulae Scientia Biologicae*, 5, 388-393.
- Naik S., Goud V., Rout P. & Dalai A. (2010) Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 578-597.
- Nickell G. (1972) The physiological ecology of upland and lowland *Panicum virgatum*. University of Oklahoma.
- Nieto M., Baraza E., Cifré J. & Gulías J. (2015) Determination of germination patterns of different populations of three mediterranean perennial grasses: *Ampelodesmos mauritanica*, *Oryzopsis miliacea* and *Dactylis glomerata*. En J. Cifre, I. Janer, J. Gulías, J. Jaume & H. Medrano, Pastos y Forrajes en el Siglo XXI, 54<sup>a</sup> Reunión científica de la SEEP. Palma de Mallorca: Sociedad española para el Estudio de los Pastos.
- Nigam P. & Sing A. (2011) Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37, 52-68.
- Nilsen E. & Orcutt D. (1996) Physiology of plants under stress. Abiotic factors. New York: John Wiley & Sons.
- Nippert JB., Fay PA. & Knapp AK. (2007) Photosynthetic traits in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> grassland species in mesocosm and field environments. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 412-420.
- Nogués S. & 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., Tcherkez G., Cornic G. & Ghashghaie J. (2004) Respiratory carbon metabolism following illumination in intact French bean leaves using <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C labelling. *Plant Physiology*, 136, 3245-3254.
- 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 Communication in Mass Spectrometry*, 22, 1017-1022.
- Nogués S. & Azcón-Bieto J. (2013) Potential of Local Bio-Geoengineering to mitigate dangerous temperature increases in a global warming scenario. *Journal Earth Science of Climate Change*, 4, 143.

- Nogués S., Aljazairi S., Arias C., Sánchez E. & 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.
- O'Leary M. (1981) Carbon isotope fractionation in plants. *Photochemistry*, 20 (4), 553-567.
- OECD (1997) Glossary of environment statistics, studies in methods. New York: United Nations.
- Osmond C., Winter K. & Ziegler H. (1982) Functional significance of different pathways of CO<sub>2</sub> fixation in photosynthesis. In O. Lange, P. Nobel, C. Osmond & H. Ziegler, *Physiological plant ecology II. Encyclopedia of plant physiology* (pages 479-549). Berlin: Springer-Verlag.
- Osmond C. & Grace S. (1995) Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*, 46, 1351-1362.
- Papazoglou E., Karantounias G., Vemmos S. & Bouranis D. (2005) Photosynthesis and growth responses of giant reed (*Arundo donax* L.) to the heavy metals Cd and Ni. *Environment International*, 31, 243-249.
- Passioura J., Condon A. & Richards R. (1993) Water deficits, the development of leaf area and crop productivity. *Water deficits Plant responses from cell to community*. Oxford: BIOS Sci. Ltd.
- Pearcy RW. & Ehleringer JR. (1984) Comparative ecophysiology of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Plant, Cell and Environment*, 7, 1-13.
- Pilu R., Bucci A., Badone F. & Landoni M. (2012) Giant reed (*Arundo donax* L.): A weed plant or a promising energy crop? *African Journal of Biotechnology*, 11, 9163-9174.
- Pilu R., Manca A., Landoni M. & Agrarie S. (2013) *Arundo donax* as an energy crop: pros and cons of the utilization of this perennial plant. *Maydica*, 58.
- Pinto H., Sharwood R., Tissue D. & Ghannoum O. (2014) Photosynthesis of C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> and C<sub>4</sub> grasses at glacial CO<sub>2</sub>. *Journal of Experimental Botany*, 65, 3669-3681.
- Pompeiano A., Vita F., Miele S. & Guglielminetti L. (2015) Freeze tolerance and physiological changes during cold acclimation of giant reed (*Arundo donax* L.). *Grass and Forage Science*, 70 (1), 168-175.
- Porter C. (1966) An analysis of variation between upland and lowland switchgrass, *Panicum virgatum* L., in central Oklahoma. *Ecology*, 47, 980-992.
- Portis A. & Parry J. (2007) Discoveries in Rubisco (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective. *Photosynthesis Research*, 94, 121-143.
- Price G., Evans J., von Caemmerer S., Yu J. & Badger M. (1995) Specific reduction of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity by antisense RNA reduces CO<sub>2</sub>

assimilation via a reduction in ribulose-bisphosphate regeneration in transgenic tobacco plants. *Planta*, 195, 369-378.

Quinn LD., Straker KC., Guo J., Kim S., Thapa S., Kling G., Lee DK. & Voigt TB. (2015) Stress-tolerant feedstocks for sustainable bioenergy production on marginal land. *Bioenergy Research*, 8, 1081-1100.

Renewable Fuels Agency (2008) The Gallagher Review of the indirect effects of biofuels production. East Sussex: Renewable Fuels Agency.

Rivelli AR., Lovelli S. & Perniola M. (2002) Effects of salinity on gas exchange, water relations and growth of sunflower (*Helianthus annuus*). *Functional of Plant Biology*, 29, 1405-1415.

Robinson D., Handley L., Scrimgeour C., Gordon C., Forster B. & Ellis R. (2000) Using stable isotope natural abundances ( $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$ ) to integrate the stress responses of wild barley (*Hordeum spontaneum* C Koch.) genotypes. *Journal of Experimental Botany*, 51, 41-50.

Roscher A., Kruger N. & Ratcliffe R. (2000) Strategies for metabolic flux analysis in plants using isotope labelling. *Journal of Biotechnology*, 77, 81-102.

Rossa B., Tuffers A., Naidoo G. & Von Willert D. (1998) *Arundo donax* L. (Poaceae) - A C<sub>3</sub> species with unusually high photosynthetic capacity. *Botanica Acta*, 111, 216-221.

Sage R., Percy R. & Seeman J. (1987) The nitrogen use efficiency of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. III Leaf nitrogen effects on the activity of carboxylating enzymes in *Chenopodium Album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.). *Plant Physiology*, 85, 355-359.

Sage R. (2001) Environmental and evolutionary preconditions for the origin and diversification of the C<sub>4</sub> photosynthetic syndrome. *Plant Biology*, 3, 202-213.

Sage R. (2004) The evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis. *New Phytologist*, 161, 341-370.

Sage R. & McKnown A. (2006) Is C<sub>4</sub> photosynthesis less phenotypically plastic than C<sub>3</sub> photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*, 57 (2), 303-317.

Sánchez R., Hall A., Trapani N. & de Hunau R. (1983) Effects of water stress on the chlorophyll content, nitrogen level and photosynthesis of leaves of two maize genotypes. *Photosynthesis Research*, 4, 35-47.

Sanderson MA., Reed RL., Mc Laughlin SB., Wullschlegler SD., Conger BV., Parrish DJ., Wolf DD., Taliaferro C., Hopkins AA., Ocumpaugh WR., Hussey MA., Read JC. & Tischler CR. (1996) Switchgrass as a sustainable bioenergy crop. *Bioresource Technology*, 56, 83-93.

Sanderson MA., Reed RL., Ocumpaugh WR., Hussey MA., Van Esbroeck G., Read JC., Tischler CR. & Hons FM. (1999) Switchgrass cultivars and germplasm for biomass feedstock production in Texas. *Bioresource Technology*, 67, 209-219.

- Santos C. (2004) Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Scientia Horticulturae*, 109, 93-99.
- Sarath G., Mitchell R., Sattler S., Funnell D., Pedersen J., Graybosch R. & Vogel KP. (2008) Opportunities and roadblocks in utilizing forages and small grains for liquid fuels. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 343-354.
- Schenk P., Thomas-Hall S., Stephens E., Marx U., Mussgnug J., Posten C., Kruse O. & Hankamer B. (2008) Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*, 1, 20-43.
- Schulze E., Beck E. & Müller-Hohenstein K. (2005) Environment as a stress factor: stress physiology of plants. In E. Schulze, E. Beck & K. Müller-Hohenstein, *Plant Ecology* (pages 7-21). Heidelberg: Springer-Verlag.
- Sharkey T. (1990) Water stress effects on photosynthesis. *Photosynthetica*, 24, 651.
- Sheffield J. & Wood E. (2008) Projected changes in drought occurrence under future global warming from multi-model, multi-scenario, IPCC AR4 simulations. *Climatic Dynamics*, 31, 79-105.
- Sinclair WB., Barholomew ET. & Ramsey RC. (1945) Analysis of the organic acids of orange juice. *Plant Physiology*, 20, 3-18.
- Sixto H., Hernández M., Barrio M., Carrasco J. & Cañellas I. (2007) Plantaciones del género *Populus* para la producción de biomasa con fines energéticos. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales*, 16, 277-294.
- Stepien P. & Klobus G. (2005) Antioxidant defense in the leaves of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants under salinity stress. *Physiologia Plantarum*, 125, 31-40.
- Stroup S., Sanderson M., Muir J., McFarland M. & Reed R. (2003) Comparison of growth and performance in upland and lowland switchgrass types to water and nitrogen stress. *Bioresource Technology*, 83, 65-72.
- Takahashi S. & Badger MR. (2011) Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends in Plant Science*, 16, 53-60.
- Tambussi EA. (2004) Fotosíntesis, fotoprotección, productividad y estrés abiótico: Algunos casos de estudio. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Taylor A. & Craig S. (1971) Plants under climatic stress. II. Low temperature, high light effects on chloroplast ultrastructure. *Plant Physiology*, 47, 719-725.
- Taylor S., Ripley B., Woodward F. & Osborne C. (2011) Drought limitation of photosynthesis differs between C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> grass species in a comparative experiment. *Plant, Cell and Environment*, 34, 65-75.

- Tcherkez G., Nogués S., Belton J., Cornic G., Adeline MT. & Deléens E. (2003) Metabolic origin of carbon isotope composition of leaf dark-respired CO<sub>2</sub> in French bean. *Plant Physiology*, 131, 237-244.
- Tcherkez G. & 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 of Experimental Botany*, 59, 1685-1693.
- Triana F., Nassi o Di Nasso N., Ragaglini G., Roncucci N. & Bonari E. (2015) Evapotranspiration crop coefficient and water use efficiency of giant reed (*Arundo donax* L.) and miscanthus (*Miscanthus x giganteus* Freef et Deu.) in a Mediterranean environment. *Global Change Biology Bioenergy*, 7, 811-819.
- Tsimplis M. & Rixen M. (2002) Sea level in the Mediterranean Sea: The contribution of temperature and salinity changes. *Geophysical Research Letters*, 29 (23), 2136-2140.
- Turner N. (1988) Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. *Irrigation Science*, 9, 289-308.
- Turner CL., Kneisler JR. & Knapp AK. (1995) Comparative gas exchange and nitrogen responses of the dominant C<sub>4</sub> grass *Andropogon gerardii* and five C<sub>3</sub> forbs to fire and topographic position in tallgrass prairie during a wet year. *International Journal of Plant Science*, 156, 216-226.
- Várllyay G. (1994) Climate change, soil salinity and alkalinity. In M. Rounsevell & P. Loveland, Soil responses to Climate Change (pages 39-54). Heidelberg, Germany: NATO ASI Series 23, Springer-Verlag.
- Warner D., Maurice S. & Edwards G. (1987) Photosynthesis, leaf anatomy and cellular constituents in the polyploid C<sub>4</sub> grass *Panicum virgatum*. *Plant Physiology*, 84, 461-466.
- Wiegmann K., Hennenberg K. & Fritsche U. (2008) Degraded land and sustainable bioenergy feedstock production. Issue Paper of the Joint International Workshop on High Nature Value Criteria and Potential for Sustainable Use of Degraded Lands (pages 1-10). Paris: Oeko-Institut (Darmstadt).
- Wilhelm C. (2014) Salt stress resistance - multisite regulation in focus. *Journal of Plant Physiology*, 17, 1.
- Williams C., Biswas T., Schrale G., Virtue J. & Heading S. (2008) Use of saline land and wastewater for growing a potential biofuel crop (*Arundo donax* L.). Conference, Melbourne, Australia.
- Williams C., Biswas T., Cjvyl L. & Dyson C. (2010) Salt tolerance and nutrient dynamics of *Arundo donax*. In C. Williams & T. Biswas, Commercial potential of Giant Reed for pulp, paper and biofuel production (pages 20 – 41). Australia: Rural Industries Research and Development Corporation, Australian Government.

- Yousfi S., Serret M. & Araus J. (2009) Shoot  $\delta^{15}\text{N}$  gives a better indication than ion concentration or  $\Delta^{13}\text{C}$  of genotypic differences in the response of durum wheat to salinity. *Functional Plant Biology*, 36, 144-155.
- Yousfi S., Serret D., Voltas J. & Araus J. (2010) Salinity and water stress during the reproductive stage on growth, ion concentrations,  $\Delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  of durum wheat and related amphiploids. *Journal of Experimental Botany*, 61, 3529-3542.
- Zhang J., Feng Z., Cregg B. & Schumann C. (1997) Carbon isotopic composition, gas exchange, and growth of three populations of ponderosa pine differing in drought tolerance. *Tree Physiology*, 17, 461-466.
- Zhang Y., Zapala J., Jakubowski A., Price D., Acharya A., Wei Y., Brummer EC., Kaeppler SM. & Casler MD. (2011) Natural hybrids and gene flow between upland and lowland switchgrass. *Crop Science*, 51, 2626-2641.



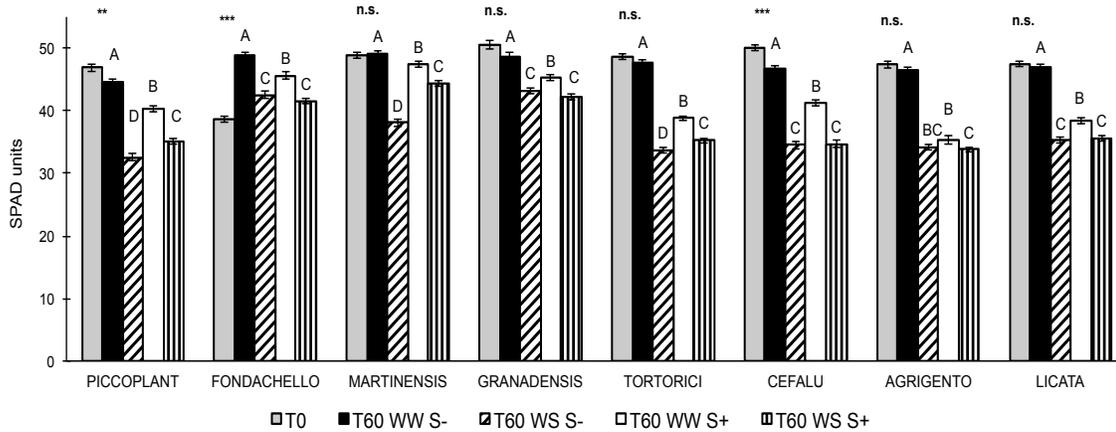
# **SUPPLEMENTARY MATERIAL**



**Experiment I: “Salinity and water stress effects on biomass production in different *Arundo donax* L. clones”**

**SM 1.1.-** Correlation values and significant differences between  $A_{sat}$ ,  $g_s$  and time for the eight clones of *A. donax* L. for each treatment. \*\* significant correlation at  $P < 0.01$  (bilateral).

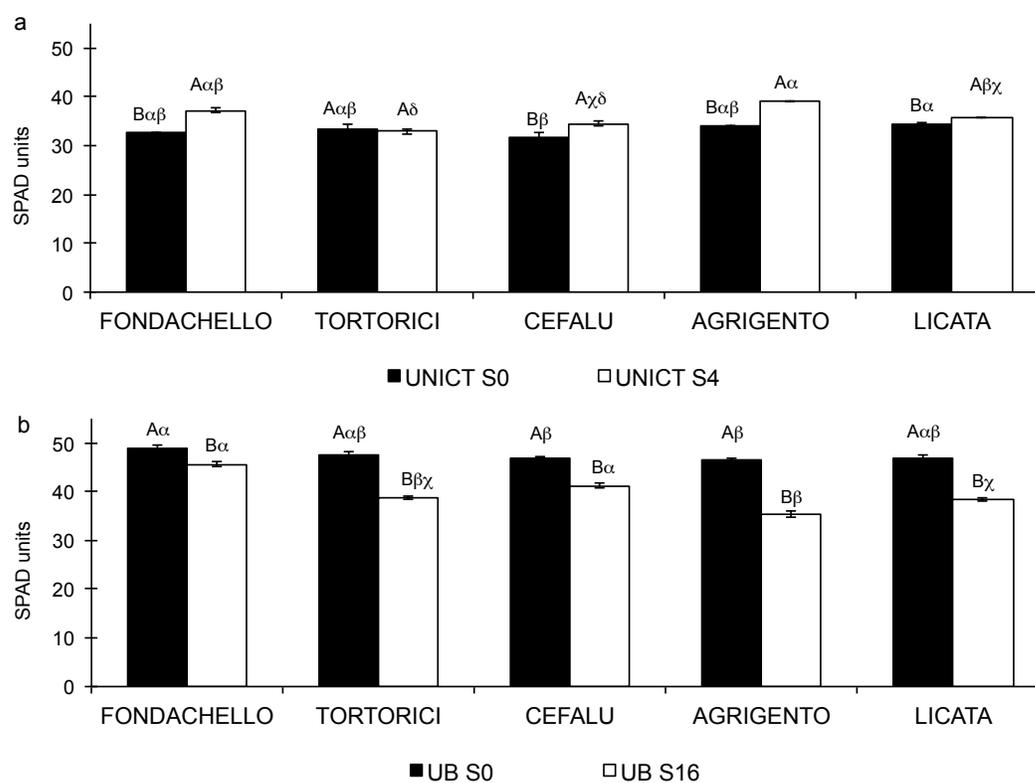
	WW S-			WS S-			WW S+			WS S+		
	Time	$A_{sat}$	$g_s$	Time	$A_{sat}$	$g_s$	Time	$A_{sat}$	$g_s$	Time	$A_{sat}$	$g_s$
Time	1			1			1			1		
$A_{sat}$	-0.393**	1		-0.742**	1		-0.844**	1		-0.806**	1	
$g_s$	-0.371**	0.348**	1	-0.634**	0.909**	1	-0.717**	0.844**	1	-0.728**	0.954**	1



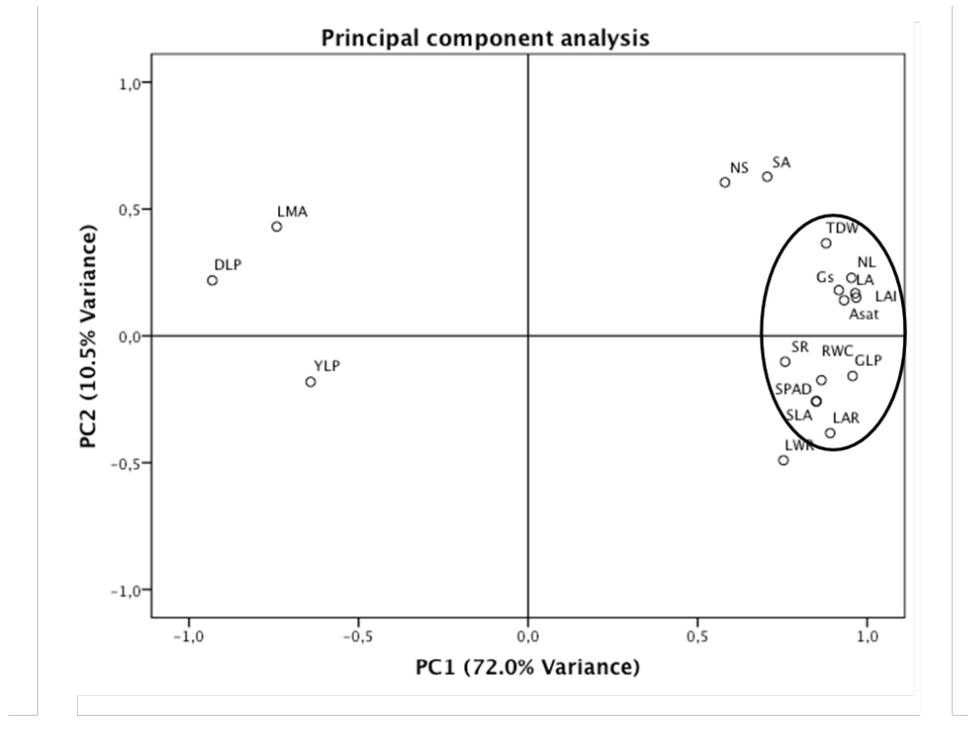
**SM 1.2.-** Changes in chlorophyll content (SPAD units) between the beginning (T0, grey bars) and the end of the experiment (T60) for each clone and treatment (WW S-, WS S-, WW S+ and WS S+). Bars are the means of three replicates  $\pm$  standard errors (SE). Data were analysed with an ANOVA Tukey analysis. Different capital letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments for the same clone. Differences between T0 and T60 for control treatment (WW S-) are shown (n.s., non-significant; \*\* significant at  $P < 0.01$ ; \*\*\*significant at  $P < 0.001$ ).

**SM 1.3.-** Correlation values and significant differences between  $A_{sat}$ , SPAD, Specific Leaf Area (SLA) and Total Dry Weight (TDW) for the eight clones of *A. donax*. \*\* significant correlation at  $P < 0.01$  (bilateral).

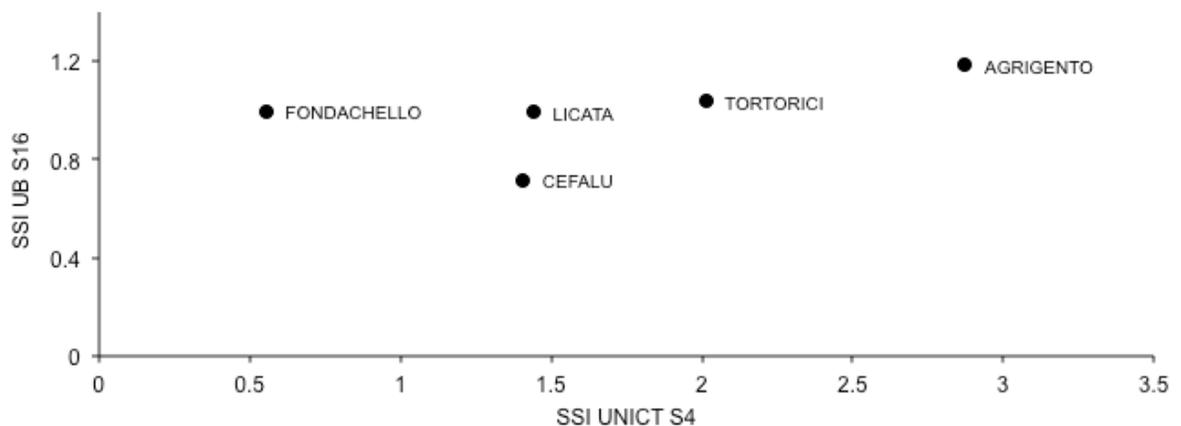
	$A_{sat}$	SPAD	SLA	TDW
$A_{sat}$	1			
SPAD	0.459**	1		
SLA	0.736**	0.541**	1	
TDW	0.864**	0.453**	0.613**	1



**SM 1.4.-** Changes in chlorophyll content (SPAD units) in each clone at Tf, respectively for each treatment: a) UNICT S0 and UNICT S4; b) UB S0 and UB S16. Values are the mean of three replicates  $\pm$  standard error (SE). Different capital letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments for the same location; different Greek letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between clones for same treatment and location.



**SM 1.5.-** Principal component analysis (PCA) and variance (%) of each component. The most significant and positive parameters of component 1 (above 0.750) were selected: Green Leaf Area (gLA), % Green Leaves (GLP), Number of leaves (NL),  $A_{sat}$ , % Dry Leaves (DLP),  $g_s$ , Leaf Area Ratio (LAR), Total Dry Weight (TDW), Relative Water Content (RWC), Specific Leaf Area (SLA), SPAD and Shoot/Root (SR). Non-selected parameters were % Dry Leaves (DLP), Leaf Mass Area (LMA), % Yellow Leaves (YLP), Number of Stems (NS), Stem Area (SA) and Leaf Weight Ratio (LWR).

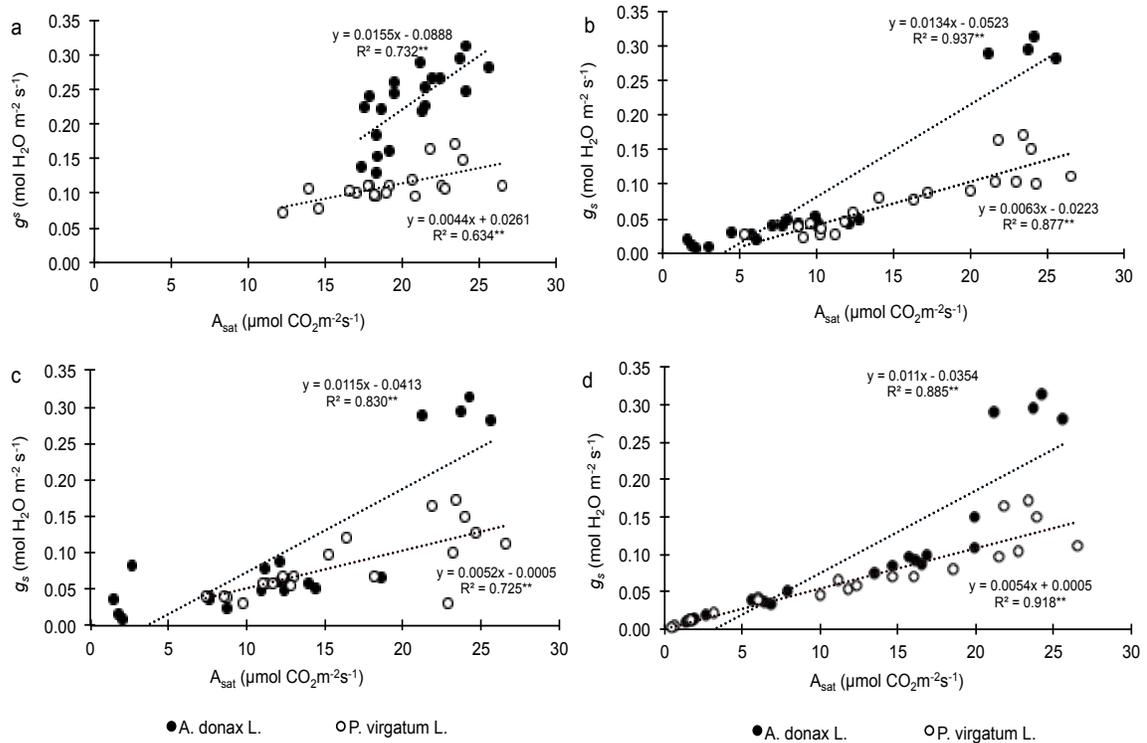


**SM 1.6.-** 2-D graphic representing stress susceptibility index (SSI) of each clone according to UNICT S4 (X axis) and UB S16 (Y axis). Higher SSI values indicate lower tolerance to stress.

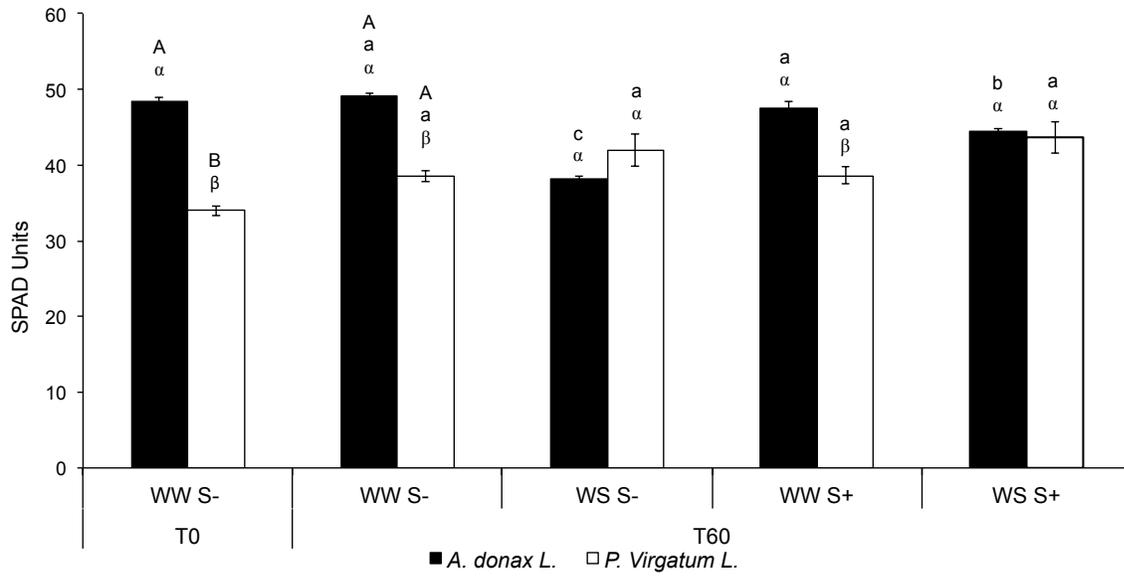
**Experiment II: "The response of *Arundo donax* L. (C<sub>3</sub>) and *Panicum virgatum* L. (C<sub>4</sub>) to different stresses"**

**SM 2.1.-** Comparison of photosynthesis (a) and fluorescence parameters (b) of *A. donax* L. and *P. virgatum* L. at the beginning of experiment IIa (T0).  $A_{sat}$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );  $g_s$  ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );  $V_{c,max}$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );  $J_{max}$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );  $I$  (%),  $T$  ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Values are the mean ( $n=3$ )  $\pm$  SE and were analysed with a Tukey test. Asterisk represents differences between species (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ) and n.s represent non-significant differences ( $P > 0.05$ ).

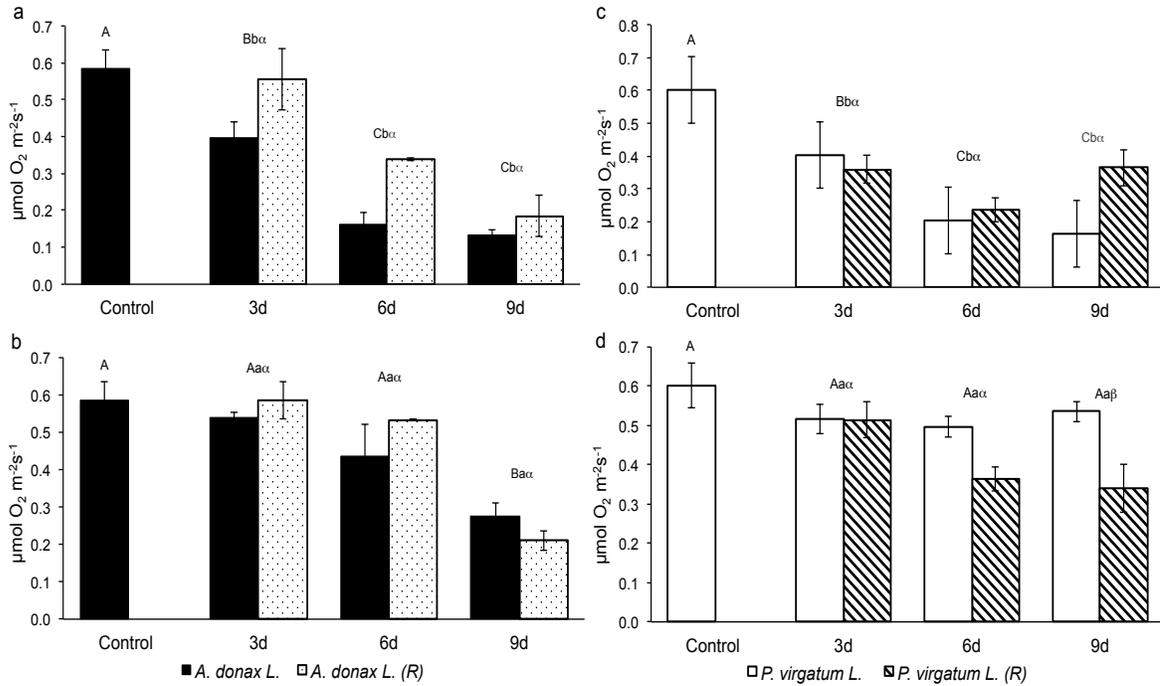
<b>a</b>	$A_{sat}$	$g_s$	$V_{c,max}$	$J_{max}$	$I$	$T$	$iWUE$
<i>A. donax</i>	23.6 $\pm 1.3$	0.295 $\pm 0.009$	111.1 $\pm 5.5$	263.2 $\pm 32.5$	22.6 $\pm 2.2$	7.2 $\pm 0.3$	3.3 $\pm 0.3$
<i>P. virgatum</i>	23.9 $\pm 1.4$	0.149 $\pm 0.018$	139.9 $\pm 3.0$	113.6 $\pm 3.5$	7.7 $\pm 2.6$	3.3 $\pm 0.1$	7.16 $\pm 0.2$
Sig.	n.s	**	**	**	*	***	***
<b>b</b>	$F_v/F_m$	$F_v'/F_m'$	$\Phi_{PSII}$	$q_p$	NPQ		
<i>A. donax</i>	0.775 $\pm 0.003$	0.499 $\pm 0.002$	0.305 $\pm 0.017$	0.610 $\pm 0.036$	1.4 $\pm 0.02$		
<i>P. virgatum</i>	0.748 $\pm 0.005$	0.361 $\pm 0.006$	0.241 $\pm 0.013$	0.670 $\pm 0.033$	1.8 $\pm 0.08$		
Sig.	*	***	*	n.s	*		



**SM 2.2.-** Bivariate correlations between  $A_{sat}$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and  $g_s$  ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) for each treatment: i) well watered with non-saline solution (WW S-; a), ii) water stress with non-saline solution (WS S-; b), iii) well watered with saline solution (WW S+; c) and iv) water stress with saline solution (WS S+; d) during the experiment (T0 - T60). Line equation, Pearson correlation coefficient and bilateral signification are shown for both species: *A. donax* L. (closed circles) and *P. virgatum* L. (open circles). \*\* Mean that correlation is significant at level 0.05 (bilateral) and 0.01 (bilateral) respectively.



**SM 2.3.-** Changes in chlorophyll content (SPAD units) between the beginning (T0) and the end of the experiment (T60) for both species and treatments (WW S-, WS S-, WW S+ and WS S+) in Exp. IIa. Data are the means of three replicates and the standard errors (SE) are shown. Data were analysed with an ANOVA Tukey analysis. Different capital letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ) between time (T0 – T60) for the same species in the control treatment (WW S-), different small letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ) between time for a same species and different Greek letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ) between species for same treatment.



**SM 2.4.-** Mitochondrial respiration rates ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) of *A. donax* L. and *P. virgatum* L. under darkness and room temperature (AD; a and c) and darkness and cold temperature (CD, b and d) and recovery (R) of Exp. IIb. Values are the mean ( $n=7$ )  $\pm$  SE and were analysed with Tukey test between time (capital letters), treatments (small letters) and between species (Greek letters;  $P < 0.05$ ).

**Experiment III: “<sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N isotope labelling to study the response of two perennial grasses (*Arundo donax* L. and *Panicum virgatum* L.) to water stress”**

**SM 3.1.-** Photosynthesis parameters (a;  $V_{c,max}$ , maximum carboxylation velocity of Rubisco;  $J_{max}$ , the rate of photosynthetic electron transport;  $l$ , stomatal limitation;  $A_{sat}$ , assimilation rate at light saturation;  $g_s$ , stomatal conductance;  $T$ , transpiration rate and  $iWUE$ , instantaneous water use efficiency) and fluorescence parameters (b;  $F_v/F_m$ , maximal photochemical efficiency in the dark –adapted stage;  $F'_v/F'_m$ , maximal photochemical efficiency in light;  $\phi_{PSII}$ , relative quantum yield of Photosystem II electron transport;  $q_p$ , photochemical quenching and NPQ, non-photochemical quenching) at the beginning of the experiment (Ti) in both species (*A. donax* L. and *P. virgatum* L.). Data are the means of three replicates and SE is shown. Data were analysed with an ANOVA Tukey analysis (ns: non-significant; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ ).

a	$A_{sat}$	$g_s$	$V_{c,max}$	$J_{max}$	$l$	$T$	$iWUE$
<i>A. donax</i>	22.9 ± 2.4	0.27 ± 0.03	140.0 ± 21.0	227.2 ± 14.2	14.2 ± 2.5	5.7 ± 0.3	4.1 ± 0.6
<i>P. virgatum</i>	22.0 ± 2.0	0.13 ± 0.02	66.7 ± 17.3	80.5 ± 16.3	6.4 ± 0.8	3.2 ± 0.4	6.9 ± 0.3
Sig.	n.s	*	*	**	*	**	*
b	$F_v/F_m$	$F'_v/F'_m$	$\Phi_{PSII}$	$q_p$	NPQ		
<i>A. donax</i>	0.797 ± 0.012	0.457 ± 0.009	0.264 ± 0.009	0.578 ± 0.010	1.7 ± 0.2		
<i>P. virgatum</i>	0.745 ± 0.011	0.329 ± 0.009	0.208 ± 0.007	0.633 ± 0.034	1.7 ± 0.3		
Sig.	*	**	**	n.s	n.s		

**SM 3.2.-** Biomass parameters (LA, Leaf Area (m<sup>2</sup>); SA, Stem Area (m<sup>2</sup>); LMA; Leaf Mass Area (g m<sup>-2</sup>); SLA, Specific Leaf Area (m<sup>2</sup> Kg<sup>-1</sup>); LAR, Leaf Area Ratio (m<sup>2</sup> Kg<sup>-1</sup>), LWR, Leaf Weight Ratio (Kg Kg<sup>-1</sup>) in both species (*A. donax* L. and *P. virgatum* L.) for each treatment: (i) Control (C, 100% FC), (ii) Mild stress (MS, 50% FC) and (iii) Severe Stress (SS, 25% FC) at the end of the experiment (Tf). Data are the means of nine replicates and the standard error is shown. Data were analysed with an ANOVA Tukey analysis. Different small letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments for the same specie and time. Different Greek letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between species for the same time and treatment.

		C			MS			SS		
		Mean	SE		Mean	SE		Mean	SE	
A. donax L.	LA	0.15	0.01	aβ	0.09	0.00	bβ	0.05	0.00	cβ
	SA	0.03	0.00	aβ	0.02	0.00	bβ	0.01	0.00	cβ
	LMA	41.21	2.38	aα	47.81	1.31	aα	47.96	2.08	aβ
	SLA	24.82	1.23	aα	21.04	0.58	bα	21.15	0.87	bα
	LAR	9.33	0.57	aα	7.73	0.29	bα	7.07	0.44	bα
	LWR	0.40	0.01	aα	0.37	0.01	abα	0.33	0.02	bα
P. virgatum L.	LA	0.49	0.03	aα	0.21	0.03	bα	0.07	0.01	cα
	SA	0.17	0.02	aα	0.07	0.01	bα	0.04	0.00	bα
	LMA	47.85	1.77	bα	63.62	8.32	bα	121.17	8.95	aα
	SLA	21.10	0.69	aα	17.15	1.42	bβ	8.61	0.62	cβ
	LAR	3.96	0.30	aβ	3.12	0.40	aβ	1.51	0.15	bβ
	LWR	0.19	0.01	aβ	0.18	0.01	aβ	0.17	0.01	aβ

**SM 3.3.-** Values of dark respiration ( $R_d$ ;  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), C content ( $\%C_c \text{ mg}^{-1}$ ), N content ( $\%N_c \text{ mg}^{-1}$ ), and  $C_c/N_c$  Ratio in both species (*A. donax* L. and *P. virgatum* L.) for each treatment: (i) Control (C, 100% FC), (ii) Mild stress (MS, 50% FC) and (iii) Severe Stress (SS, 25% FC) at the end of the experiment (Tf). (L, Leaf; S, Stem; R, Root; Rz, Rhizome). Data are the means of nine replicates and the standard error is shown. Data were analysed with an ANOVA Tukey analysis. Different capital letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments for the same organ and specie. Different small letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between organs for the same treatment and specie. Different Greek letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between species for the same organ and treatment.

		$R_d$			$C_c$			$N_c$			$C_c/N_c$			
		$\mu\text{mol gDW}^{-1} \text{s}^{-1}$			$\%C \text{ mg}^{-1}$			$\%N \text{ mg}^{-1}$						
<i>A. donax</i> L.	C	L	-12.8	1.0	Ab $\alpha$	50.7	1.6	Ba $\beta$	4.5	0.3	Aa $\alpha$	11.6	0.5	Bc $\beta$
		S	-23.1	1.5	Aa $\alpha$	50.7	0.6	Aa $\beta$	1.6	0.2	Ab $\alpha$	34.8	4.0	Aa $\beta$
		R	-24.5	1.8	Aa $\alpha$	52.3	1.5	Aa $\alpha$	1.8	0.1	Ab $\alpha$	28.8	1.5	Aab $\alpha$
		Rz	-10.5	1.3	Ab $\beta$	53.5	0.6	Aa $\alpha$	2.1	0.1	ABb $\alpha$	26.2	1.3	Bb $\beta$
	MS	L	-9.9	0.8	Ab $\alpha$	54.4	0.6	Aab $\alpha$	4.0	0.1	ABa $\alpha$	13.5	0.3	Ab $\beta$
		S	-9.9	1.0	Bb $\alpha$	52.7	0.7	Ab $\alpha$	1.8	0.3	Ab $\alpha$	35.4	4.6	Aa $\beta$
		R	-16.9	1.2	Ba $\alpha$	54.2	1.5	Aab $\alpha$	1.8	0.1	Ab $\beta$	36.2	2.8	Aa $\alpha$
		Rz	-5.4	0.9	Bc $\beta$	54.9	0.9	Aa $\alpha$	1.8	0.1	Bb $\alpha$	31.1	1.0	Aa $\alpha$
	SS	L	-8.2	0.8	Ab $\alpha$	53.2	0.4	ABa $\alpha$	3.7	0.1	Ba $\alpha$	14.6	0.4	Ac $\beta$
		S	-9.7	1.0	Bb $\beta$	54.1	1.5	Aa $\alpha$	1.7	0.1	Ac $\alpha$	34.2	2.6	Aa $\alpha$
		R	-15.3	1.6	Ba $\alpha$	54.8	0.2	Aa $\alpha$	1.7	0.1	Ac $\alpha$	32.8	2.0	Aa $\alpha$
		Rz	-3.8	0.8	Bc $\beta$	53.4	0.6	Aa $\beta$	2.2	0.1	Ab $\alpha$	25.1	1.8	Bb $\alpha$
<i>P. virgatum</i> L.	C	L	-10.5	0.9	Ab $\beta$	54.3	0.6	Aa $\alpha$	2.8	0.1	Aa $\beta$	19.1	0.3	Bc $\alpha$
		S	-9.1	1.2	Ab $\beta$	53.1	0.5	ABa $\alpha$	1.0	0.1	Bd $\beta$	60.6	7.0	Aa $\alpha$
		R	-32.5	3.5	Aa $\alpha$	52.3	1.5	Aa $\alpha$	1.9	0.1	Ab $\alpha$	29.0	1.2	Abc $\alpha$
		Rz	-23.7	4.0	Aa $\alpha$	54.8	0.7	Aa $\alpha$	1.5	0.1	Bc $\beta$	36.3	1.3	Ab $\alpha$
	MS	L	-8.5	1.2	Ab $\alpha$	54.4	0.5	Aab $\alpha$	2.5	0.1	Ba $\beta$	21.7	0.6	Ac $\alpha$
		S	-9.0	1.9	Ab $\alpha$	53.7	0.4	Ab $\alpha$	1.2	0.1	Bc $\alpha$	50.4	4.9	Aa $\alpha$
		R	-19.9	2.0	Ba $\alpha$	53.7	0.4	Ab $\alpha$	1.9	0.1	Ab $\alpha$	28.5	1.8	Abc $\beta$
		Rz	-17.5	2.8	ABa $\alpha$	55.3	0.4	Aa $\alpha$	1.8	0.1	Ab $\alpha$	32.9	2.4	Ab $\alpha$
	SS	L	-10.7	1.6	Aa $\alpha$	54.6	0.4	Aa $\alpha$	2.6	0.1	ABa $\beta$	21.1	0.8	ABa $\alpha$
		S	-12.2	0.6	Aa $\alpha$	52.1	0.2	Bb $\alpha$	1.8	0.1	Ab $\alpha$	29.1	1.6	Ba $\beta$
		R	-11.5	2.1	Ba $\alpha$	53.8	0.9	Aab $\alpha$	2.1	0.2	Aab $\alpha$	27.8	2.9	Aa $\alpha$
		Rz	-12.4	1.7	Ba $\alpha$	53.8	0.9	Aab $\alpha$	2.0	0.2	Ab $\alpha$	28.5	2.7	Aa $\alpha$

**SM 3.4.-** Statistical analysis of water stress effects on  $\delta^{13}\text{C}_R$  (‰),  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$  (‰),  $\delta^{15}\text{N}_{\text{TOM}}$  (‰) and  $\delta^{13}\text{C}_{\text{TSS}}$  (‰).

	$\delta^{13}\text{C}_{\text{TOM}}$		$\delta^{13}\text{C}_{\text{TSS}}$		$\delta^{13}\text{C}_R$		$\delta^{15}\text{N}_{\text{TOM}}$	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
Model	46.9	***	25.6	***	39.5	***	24.5	***
Specie	206.9	***	45.7	***	13.1	***	92.5	***
Time	873.0	***	605.9	***	925.3	***	438.6	***
Treatment	120.8	***	93.5	***	80.1	***	138.6	***
Organ	118.2	***	18.8	***	36.3	***	14.9	***
Specie*Time	4.4	*	4.6	*	0.9	ns	28.1	***
Specie*Treatment	31.6	***	5.3	**	18.5	***	19.8	***
Specie*Organ	24.3	***	2.5	ns	6.6	***	3.4	***
Time*Treatment	29.1	***	30.8	***	37.7	***	45.8	***
Time*Organ	35.8	***	13.4	***	17.9	***	10.0	***
Treatment*Organ	7.5	***	1.3	ns	4.6	***	3.2	**
Specie*Time*Treatment	14.0	***	6.3	***	20.3	***	6.5	***
Specie*Time*Organ	5.5	***	3.2	**	14.5	***	2.0	ns
Specie*Treatment*Organ	11.6	***	1.2	ns	4.9	***	1.4	ns
Time*Treatment*Organ	3.5	***	1.1	ns	4.4	***	1.8	*
Specie*Tiempo*Treatment*Organ	4.8	***	1.3	ns	6.6	***	0.9	ns





# Salinity and Water Stress Effects on Biomass Production in Different *Arundo donax* L. Clones

E. Sánchez<sup>1</sup> · D. Scordia<sup>2</sup> · G. Lino<sup>1</sup> · C. Arias<sup>1</sup> · S. L. Cosentino<sup>2</sup> · S. Nogués<sup>1</sup>

© Springer Science+Business Media New York 2015

**Abstract** Perennial rhizomatous grasses are regarded as leading energy crops due to their environmental benefits and their suitability to regions with adverse conditions. In this paper, two different experiments were carried out in order to study the salinity (*S*) and water stress (*WS*) effects on biomass production in giant reed (*Arundo donax* L.). In Experiment 1, eight clones of giant reed were subjected to four salinity (*S*) and water stress (*WS*) treatments: (1) well watered with non-saline solution, (2) water stress with non-saline solution, (3) well watered with saline solution and 4) water stress with saline solution. In Experiment 2, five clones of giant reed were subjected to increasing *S* levels in two locations: University of Catania (UNICT-Italy) (1) well watered with non-saline solution and (2) well watered with mild saline solution; and University of Barcelona (UB-Spain) (3) well watered with non-saline solution and (4) well watered with severe saline solution. Photosynthetic and physiological parameters as well as biomass production were measured in these plants. According to our data, giant reed seems to be more tolerant to *S* than *WS*. Both stresses mainly affected stomatal closure to prevent dehydration of the plant, eventually decreasing the photosynthetic rate. The differential performance of the giant reed clones was ranked according to their tolerance to *S* and *WS* by using the Stress Susceptibility Index. ‘Agrigento’

was the most *WS* resistant clone and ‘Martinensis’ was the most *S* resistant. ‘Martinensis’ and ‘Piccoplant’ were found to be the most suitable clones for growing under both stress conditions. Moreover, ‘Fondachello’, ‘Cefalù’ and ‘Licata’ were the most resistant clones to increasing *S* levels.

**Keywords** *Arundo donax* L · Biomass · Water stress · Salinity stress · Photosynthesis · Stress susceptibility index

## Abbreviations

$A_{\text{sat}}$	light saturated net CO <sub>2</sub> assimilation rate (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
DLP	complete dry leaves percentage (%)
DM	dry matter (g)
FC	field capacity
$g_s$	stomatal conductance (mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
gLA	green leaf area (m <sup>2</sup> )
GLP	complete green leaves percentage (%)
H	height (cm)
LAR	leaf area ratio (m <sup>2</sup> Kg <sup>-1</sup> )
LWR	leaf weight ratio (Kg Kg <sup>-1</sup> )
NL	number of leaves
NS	number of stems
PPFD	photosynthetic photon flux density
PRG	perennial rhizomatous grasses
RWC	relative water content (%)
<i>S</i>	salinity
SA	stem area (m <sup>2</sup> )
SLA	specific leaf area (m <sup>2</sup> Kg <sup>-1</sup> )
S/R	shoot/root ratio (g g <sup>-1</sup> )
SSI	stress susceptibility index
TDW	total dry weight (g)
<i>WS</i>	water stress
YLP	complete yellow leaves percentage (%)

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s12155-015-9652-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ E. Sánchez  
 elenasanchezub@gmail.com

<sup>1</sup> Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Avda. Diagonal 643, 28028 Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente – Di3A, University of Catania, Via Valdisavoia 5, 95123 Catania, Italy

## Introduction

Salinization is considered by the United Nations Environmental Programme (UNEP) to be the second largest cause of land loss [1]. According to the Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, it is estimated that 34 million hectares (11 % of the irrigated area) are affected by some level of salinization [1]. Therefore, salinity is one of the most important challenges facing the supply of food to the world's population in the future [2]. On the other hand, increases in the intensity and/or duration of water stress may occur across the globe due to recent observed changes in climate, especially in the Mediterranean region and West Africa [3, 4]. According to the FAO [5], in 2011, 38.47 % of the world's total land area was dedicated to agriculture and only 6.48 % of this agricultural area was equipped for irrigation. Moreover, it is very likely that arid and semi-arid regions, where evapotranspiration dominates, are becoming more saline [3]. Both salinity [6] and water stress [7] are among the most important environmental limitations affecting plant growth, development and crop yield in Mediterranean environments. According to Munns [8], physiological plant responses to water stress and salt stress have much in common; however, the mechanisms are extremely complex and vary with plant species as well as with the degree and time of exposure to stress.

Photosynthesis, together with cell growth, has been reported among the primary processes affected by salinity or water stress [9]. Decreases in the photosynthetic rate under both stresses may be directly associated with a decrease in  $\text{CO}_2$  availability related to stomatal closure [10], or be due to alterations of photosynthetic metabolism [11]. Therefore, photosynthetic performance involves a highly complex mechanism, where limitations are taking place at different sites of the cells and leaves are interacting on different time scales. At the same time, a greater control of transpiration water loss is achieved by reducing the leaf expansion rate, preventing dehydration [12] and acting as the first step in the process of stress acclimatisation [9]. Changes in plant morphological components have also been reported; for example, a decrease in the leaf area ratio (LAR) and specific leaf area (SLA) [13]. Stress tolerance of a plant species is usually determined by the plant's genes and also by morphological, phenological, physiological and biochemical traits [14]. Therefore, measurements of different physiological processes during the plant's response to stress provide important information about the mechanism of the plant that are intended to remove or to reduce the harmful effects of stress in the plant tissues.

Nowadays, there is a need to develop new energy sources that will be able to assume the increasing global energy consumption, which is set to increase 20.2 % from 2010 to 2020 and 30.2 % from 2020 to 2040 [15], due to the significant rise in population, which is projected to reach 9.6 billion by 2050 [16]. Moreover, there is a tendency for these new energy

sources to be respectful of the environment as a way to slow the progression of negative effects of climate change (e.g., drought, sea level rise, global warming). Within these new energy sources, the European Union is interested in developing sustainable agricultural systems to produce non-food energy crops using marginal lands and low input cultivation techniques [4].

At present, plants that are able to grow in degraded areas, including those experiencing water stress, heat, cold and soil salinity, are being extensively investigated as bioenergy feedstocks [4, 17–24]. Indeed, the cultivation of energy crops on arable land has raised a number of concerns regarding land use change (both direct and indirect land use change), because these crops should be grown on the so-called 'marginal lands' to ensure biomass production without encroaching on agricultural lands [19].

Nowadays, research has been increasingly directed towards the use of giant reed as a source of lignocellulosic biomass in warm-temperate and semi-arid environments [17, 19, 25]. Giant reed is a  $\text{C}_3$  perennial rhizomatous grass (PRG) belonging to the *Poaceae* family. It has been reported that giant reed has a high photosynthetic potential [26] and a relatively high transpiration rate; therefore, it requires more water to produce the same biomass as many  $\text{C}_4$  biomass crops [27, 28]. Related to yield, the greater biomass productivity of giant reed is also achieved under low input conditions. In a semi-arid Mediterranean environment, giant reed increased production from 11.0 Mg DM  $\text{ha}^{-1}$  under rainfed and unfertilised conditions to 28.9 Mg DM  $\text{ha}^{-1}$  with 100 % maximum evapotranspiration restitution and 120 kg N  $\text{ha}^{-1}$  [19]. Moreover, high yields under high salinity conditions have been reported in giant reed and it has been classified as a halophyte [29]. In addition, due to its high hemicellulose, cellulose and lignin contents, this crop can be used for the production of heat and electricity by direct combustion or the production of biogas and second generation bioethanol [30–33], making this crop a promising source for biomass production.

Therefore, our study seeks to address the effects of two of the most important abiotic stresses, salinity ( $S$ ) and water stress ( $WS$ ), in *Arundo donax* L. (giant reed), and we hypothesised that this species is one of the most promising bioenergy crops for feedstock production in the Mediterranean area [17]. This hypothesis is based on previous studies, where it has been classified as a salt tolerant species [29], well adapted to semi-arid environments [17, 19]. Given the aforementioned advantages, we consider it important to classify giant reed according to its tolerance or sensitivity to the two main constraints that often occur in Mediterranean marginal areas: salinity and water stress. The use of a stress susceptibility index (SSI) has been considered as a good tool to perform this task [34].

The aim of the present work was to study the effect of salinity and water stress on plant performance in different

giant reed clones. To this end, two separate experiments were carried out. Firstly, a study with both stresses was performed (Experiment 1). This experiment aimed to determine the effects of salinity and water stress on physiological performance (e.g., photosynthetic capacity, chlorophyll content, relative water content and biomass yield) on eight different giant reed clones. Moreover, a stress index was proposed in order to classify clones according to their response to salinity and water stress in plants grown in controlled environmental conditions (greenhouse). Secondly, we focused on the effect of salinity on the physiological performance of five different clones of giant reed, so different salinity levels were compared in two different locations (Experiment 2) in order to corroborate the salinity tolerance for these clones at increasing salinity levels.

## Materials and Methods

### Plant Material

The giant reed (*Arundo donax* L.) clones used in Experiments 1 and 2 are shown in Table 1. Five of the clones used in Experiments 1 and 2 (namely ‘Fondachello’, ‘Tortorici’, ‘Cefalú’, ‘Agrigento’ and ‘Licata’) were collected from the Experimental Fields at University of Catania (Italy) (hereinafter referred as UNICT) (10 m a.s.l., 37°24’N, 15°03’E), and their sites of origin are reported in Cosentino et al. [35]. Two clones (namely ‘Martinensis’ and ‘Granadensis’) used in Experiment 1 were collected in different riparian areas of Spain, and a commercial clone (‘Piccoplant’) used in Experiment 1 was provided by a private company (Piccoplant, Oldenburg, Germany).

In order to reduce heterogeneity at the beginning, careful multiplication of rhizomes was done to a similar fresh weight (i.e., the initial fresh weight ranged from 18.3±1.4 g in Piccoplant to 54.6±6.5 g in Agrigento in Experiment 1, and from 25.4±3.6 g in Tortorici to 52.8±2.2 g in Licata in Experiment 2). The initial weight difference was imposed by the dimension and position of the single visible bud per rhizome.

## Experimental Design

### Experiment 1: Screening for Salinity and Water Stress

Plants were obtained from multiplication of rhizomes during January 2013. Plantlets were grown in a greenhouse at the Experimental Field Service of University of Barcelona (Barcelona, Spain) in 5 L plastic pots containing peat:perlite:vermiculite (3:1:1), and irrigated with a complete Hoagland solution [36]. The average temperature and vapor pressure deficit (VPD) during the growth period was 25/15 °C day/night and 0.75 kPa, respectively. Relative humidity ranged from 40 to 65 % and the maximum PPFD was ~1000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. The experiment was carried out from April to June 2013.

Four months after planting, plants were separated into four treatments. Half of the plants were well watered at 100 % field capacity (FC) and half of the plants (randomly selected) were exposed to water stress (WS) conditions (with water withholding) maintaining field capacity at 25 %. Then, the well watered and WS plants were equally divided between salinity (S; 16 mS cm<sup>-1</sup> Hoagland solution) and non-saline conditions (1 mS cm<sup>-1</sup> Hoagland solution). Saline solution was prepared by adding NaCl (PANREAC, 99 % sodium chloride) to a complete Hoagland solution until it reached the appropriate saline concentration, as checked by a conductivity meter (Hanna Instruments, Romania). Consequently, a total of three plants per clone were subjected to the following treatments: (1) well watered with non-saline solution (WW S-), (2) WS with non-saline solution (WS S-), (3) well watered with saline solution (WW S+) and (4) WS with saline solution (WS S+). At the beginning of the experiment (T0), plants had two stems, a plant height from 30 to 60 cm and between 6 and 8 fully collared leaves.

Plants were subjected to these treatments for 2 months and parameters were measured in each plant every 15 days (T15, T30, T45) until the end of the experiment (i.e., T60).

### Experiment 2: Screening for Increasing Salinity Levels

The screening of mild S stress was performed at UNICT (Italy) from May to December 2012 in pots with a diameter

**Table 1** Name, place of collection and additional information for the eight clones of *Arundo donax* L. used in both experiments (m a.s.l. = meters above sea level)

Ecotype	Place of collection	Additional information	Experiment
Piccoplant	Oldenburg (Germany)	Commercial ecotype	1
Martinensis	San Martí Sarroca (Catalonia, Spain)	291 m a.s.l.	1
Granadensis	Granada (Andalusia, Spain)	773 m a.s.l.	1
Fondachello	East Sicily (Italy)	1 m a.s.l.	1 and 2
Tortorici	North of Sicily (Italy)	450 m a.s.l.	1 and 2
Cefalú	North of Sicily (Italy)	16 m a.s.l.	1 and 2
Agrigento	South of Sicily (Italy)	230 m a.s.l.	1 and 2
Licata	South of Sicily (Italy)	8 m a.s.l.	1 and 2

of 24 cm and with a capacity of 9.5 L, arranged in a randomised block experimental design with three replications. The pots arranged in an open space without any control of temperature, humidity, VPD or other environmental variables. During the experimental period, monthly maximum and minimum temperatures increased from May (25.9 and 10.7 °C, respectively) to June (32.2 and 14.7 °C) and peaked in July and August (35.7 and 19.1 °C, in the average) to decrease in September (31.9 and 17.2 °C), October (27.1 and 14.7 °C), November (22.3 and 10.8 °C) and the first 10 days of December (15.1 and 5.1 °C), when the harvest was carried out.

The substrate used was sphagnum peat with the following characteristics: 34 % C<sub>org</sub>, N<sub>org</sub> 0.2 %, dry substance 68 %, pH 5.0 to 6.5. Two treatments were studied: (1) Control (UNICT S0), where plants were watered with tap water (no NaCl added); and (2) mild S stress (UNICT S4) where plants were watered with a saline solution of 4 mS cm<sup>-1</sup>. At each irrigation time, NaCl was added to 17 L tap water for a total amount of 21±1.5 g of NaCl for S4 treatment, and the values were checked by means of a Eutech Cond 6+ conductivity meter (Thermo Fisher Scientific Inc.). All pots were maintained in well-watered condition with irrigation supplied up to FC twice a week.

The screening of severe S stress was performed at the greenhouse of the Experimental Fields of the University of Barcelona (Spain) (hereinafter referred as UB) from April to June 2013. Temperature was controlled daily at the greenhouse (25/18 °C day/night). Two treatments were studied: (1) Control (UB S0), where plants were watered with 1 mS cm<sup>-1</sup> Hoagland solution (no salt added); and (2) severe S stress (UB S16), where plants were watered with a saline solution of 16 mS cm<sup>-1</sup>. Growing conditions are the same as reported above for Experiment 1.

## Measurements

### Gas Exchange

Measurements of carbon assimilation ( $A_{\text{sat}}$ ;  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) and stomatal conductance ( $g_s$ ;  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) were carried out using a portable photosynthesis system Li6400 (Li6400, Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA) provided with a Leaf Chamber Fluorometer (6400–40) of 2 cm<sup>2</sup> and a 10 % blue light source. Measurements were carried out at 25 °C with a light saturated rate of 1200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  of PPFD, a flow rate of 500  $\mu\text{mol s}^{-1}$  and at a [CO<sub>2</sub>] level of 400 ppm ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ). In Experiment 1, measurements were carried out in each clone at treatment ( $n=3$ ) at the beginning of the experiment (T0) and every 15 days (T15, T30, T45, T60) between 10:00 and 18:00 h, and the VPD average was 2.37 (kPa) at T0, 2.93 (kPa) at T15, 2.39 (kPa) at T30, 2.71 (kPa) at T45 and 2.62 (kPa) at T60. The experiment began in late March 2013. T0 was done the previous days and

measurements at regular time intervals were made on 12–13 April (T15) and 27–28 April (T30), 13–14 May (T45) and 2–3 June (T60).

In Experiment 2, UB measurements were carried out after 120 days (Ti DAT) and 180 days (Tf DAT) in the conditions described above. Gas exchange was measured on the third fully collared leaf at the moment of maximum intensity of solar radiation from 12:00 to 14:00 and after 63 and 116 days after transplanting (referred as Ti and Tf DAT) at UNICT. Maximum air temperature at UNICT (as average of measurements) was 33.8 °C at Ti and 32.9 °C at Tf; average PARi and average VPD were 1664.2  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  of PPFD and 3.68 (kPa) at Ti and 1564.8  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  of PPFD and 3.46 (kPa) at Tf, respectively and 2.37 (kPa) at Ti and 2.62 (kPa) at Tf at UB.

### Chlorophyll Content

Chlorophyll content was measured in the last or second last fully collared leaf of all plants assayed using a portable meter (Minolta SPAD 502 Meter, Plainfield, IL, USA) every 15 days in Experiment 1 and at Ti and Tf in both locations in Experiment 2. Five measurements were performed per leaf, from the middle of the leaf (each measurement is the mean value of six determinations per treatment).

### Relative Water Content

Relative water content (RWC, %) of leaves was determined as  $(FW-DM)/(TW-DM) \times 100$ , where *FW* is the fresh weight, *DM* is the dry matter after being dried in an oven at 60 °C until constant weight was reached, and *TW* is the turgid weight of the leaf after equilibration in distilled water for 24 h at 4 °C. RWC was calculated as the mean of three leaves of each clone and treatment every 15 days.

### Biomass Parameters

At the end of the Experiment 1 (T60) and Experiment 2 (Tf), whole plants were harvested, weighed and oven dried at 60 °C until constant weight was reached. Subsequently, the dry biomass of shoots and roots was determined. Total fresh weight and plant leaf area were estimated prior to drying using a flat-bed scanner (Hewlett-Packard ScanJet model Iicx, San Diego, USA) and analysed with an image processing program (Image, University of Sheffield, 2003). Parameters such as height along the longest stem from the base to the latest totally expanded leaf (H; cm), number of leaves (NL) and stems per plant (NS), green leaf area (gLA; m<sup>2</sup>) and stems area (SA; m<sup>2</sup>) were measured. Stem area was calculated from the formula for calculating the area of a cylinder, where the height was the stem height and an average ( $n=3$ ) of the diameter was measured with a caliper. The percentage of complete green, complete yellow and complete dry leaves (GLP, YLP, DLP,

respectively; %), total dry weight (TDW; g), the shoot/root ratio (S/R,  $\text{g g}^{-1}$ ), specific leaf area (SLA;  $\text{m}^2 \text{Kg dry leaves}^{-1}$ ), leaf area ratio (LAR;  $\text{m}^2 \text{Kg total dry weight}^{-1}$ ) and leaf weight ratio (LWR;  $\text{Kg dry leaves Kg}^{-1}$  total dry weight) were calculated.

### Statistical Analysis

All studied parameters were analysed by means of the general lineal model (GLM) procedure by two factors and interactions, considering treatment and clone as “fixed factors”. Statistical analysis was conducted with the SPSS 21.0 software package. The means±standard errors (SE) of each replicates were calculated for each measured parameter. When a particular F-test was significant, we compared the means using a Tukey multiple comparison. The results were accepted as significant at  $P < 0.05$ .

### Experiment 1 and 2: Stress Susceptibility Index

In order to identify the most important parameters to be used in the index, a factorial analysis (principal component analysis, PCA) was carried out. Once the most important and common parameters in Experiment 1 and Experiment 2 ( $A_{\text{sat}}$ ,  $g_s$ , GLP, TDW, S/R, SLA) were selected, SSI was calculated using the following relationship [37] for each treatment and clone:

$$\text{SSI} = [(1 - (Y_s/Y_p))]/[(1 - (X_s/X_p))]$$

where  $Y_s$ ,  $Y_p$ ,  $X_s$  and  $X_p$  represent parameter under stress, parameter under non-stress conditions for each clone, parameter mean under stress and parameter mean under non-stress conditions for all clones, respectively. An average of the results was done in order to classify clones for their tolerance or sensitivity to different stresses.

## Results

### Experiment 1: Screening for Salinity and Water Stress

#### Gas Exchange

Significant differences were found between clones for  $A_{\text{sat}}$  ( $P=0.014$ ) and  $g_s$  ( $P=0.010$ ) at the beginning of the experiment (T0). Granadensis, Tortorici, Agrigento, Fondachello and Cefalù showed the highest values of  $A_{\text{sat}}$  (Fig. 1), whereas Piccoplant and Martinensis showed the lowest values. In general,  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  decreased slightly in the control treatment (WW S-) for almost every clone during the experiment (Fig. 1). Significant differences in  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  were found between measuring periods, treatment, clone and interactions. A highly positive and significant correlation was found

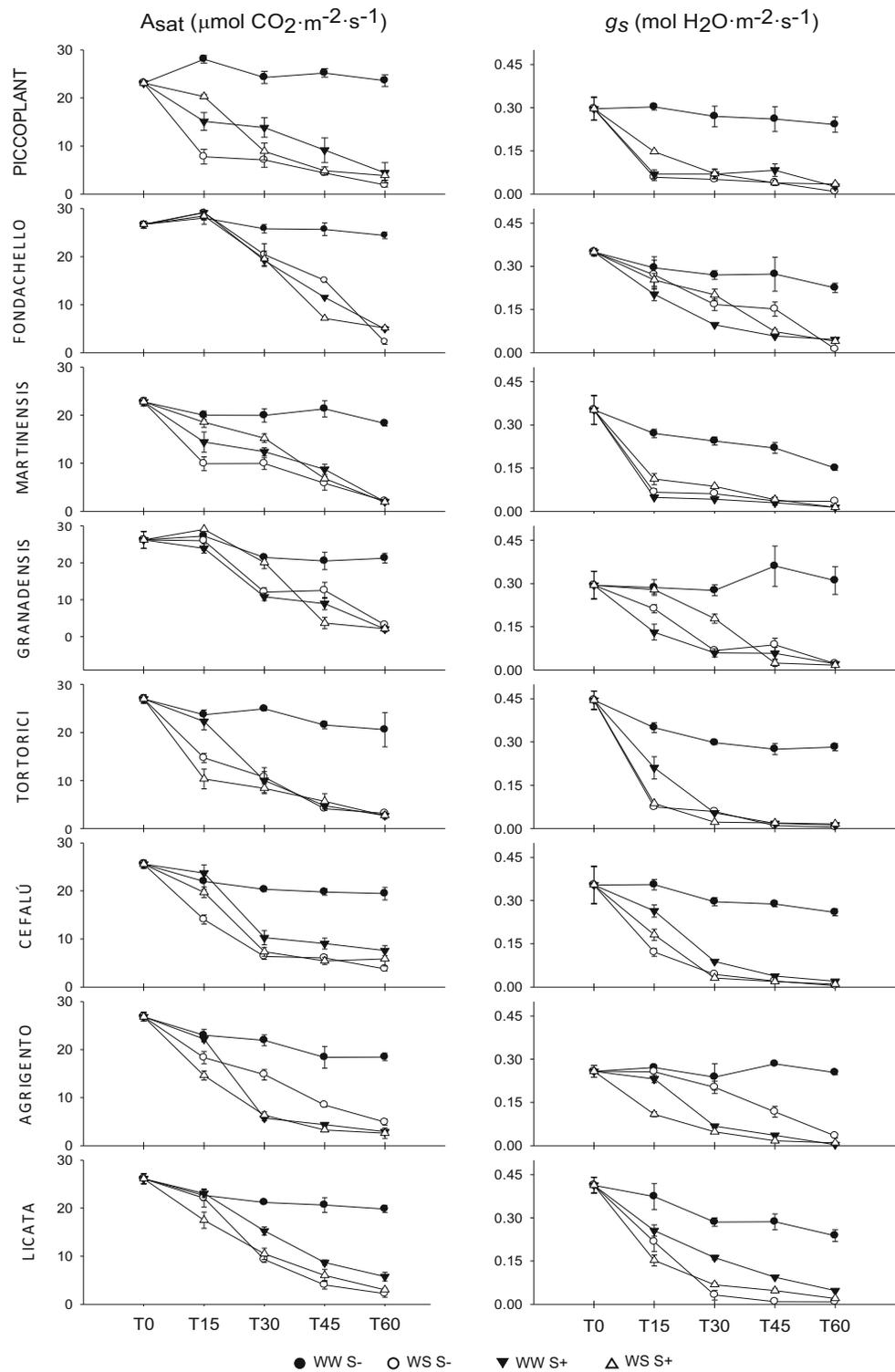
between  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  during the experiment ( $R^2=0.886^{**}$ ; correlation was significant at  $p < 0.01$ ). For each of the four treatments and across the set of eight clones, we studied the linear correlation of  $g_s$  against  $A_{\text{sat}}$  and time.  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  were strongly and positively correlated ( $P=0.001$ ) in the WS treatments (WS S-;  $R^2=0.909$  and WS S+;  $R^2=0.954$ ), and remained positively correlated in the S treatment (WW S+;  $R^2=0.844$ ). Both parameters were negatively correlated with time in each treatment, with the correlation being slightly stronger for  $A_{\text{sat}}$  than for  $g_s$ . In the control treatment, the correlations were less significant (ESM 1).

$A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  markedly decreased at T60 (between 70.3 and 91.3 %) in every stress treatment for each clone ( $P=0.001$ ) in relation with T0 (Fig. 1). In general, all clones showed lower values of  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  at T15 in all stress treatments apart from Fondachello and Granadensis, where no significant differences were found in any treatments with respect to the control. At T30, Fondachello showed higher values of  $A_{\text{sat}}$  in each stress treatment in comparison to the other clones. In contrast, Cefalù showed the lowest values in WS S- and Agrigento in both WW S+ and WS S+. As a whole, similar decreases were observed in each clone at T45. In the WS S+ treatment, a large decrease was observed in Fondachello and Granadensis between T30 and T45.

Interestingly, some clones (Piccoplant, Martinensis, Cefalù, Licata) seemed to be more affected by WS (WS S-) than by S treatments (WW S+ and WS S+) during the first month of the experiment, according to their low  $A_{\text{sat}}$  values (Fig. 1). However, no differences in  $A_{\text{sat}}$  were found between treatments at the end of the experiment (T60) ( $P=0.325$ ). Some clones (Martinensis, Granadensis and Tortorici) showed similar values, whereas others were more affected by one of the stresses. Piccoplant, Licata and Fondachello underwent the greatest decrease in  $A_{\text{sat}}$  with respect to the value at T0 in WS S- (91.7, 91.5 and 91.5 %, respectively), while Agrigento decreased by only 81.7 %. WW S+ had less effect on Cefalù, Licata and Piccoplant (70.3, 77.9 and 80.7 %, respectively), whereas Granadensis was substantially affected (92.1 %). In relation to WS S+, Granadensis was the most affected clone (91.8 %), while Cefalù, Fondachello and Piccoplant were the least affected, decreasing by only 77.1, 80.7 and 83.2 % with respect to the T0 values.

However, different clones had different performances under stress over time. Whereas some ecotypes (Granadensis, Fondachello and Licata) showed negligible stress effects with respect to the control until T30, other clones (Piccoplant, Martinensis, Tortorici and Agrigento) were most affected with short-term stress, especially by WS treatments. Over the short term (T15), no S effect was found in the clones except for Piccoplant and Martinensis. As expected, after a month (T30) the stress effect in plants was higher, although no clear pattern was found between treatments: Piccoplant, Cefalù and Licata were the less affected by S, Martinensis and

**Fig. 1** Changes in  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  during T0, T15, T30, T45 and T60 in each clone, respectively, for each treatment (WW S-, WS S-, WW S+ and WS S+). Data are the means of three replicates and the standard errors (SE) are shown when larger than the symbols

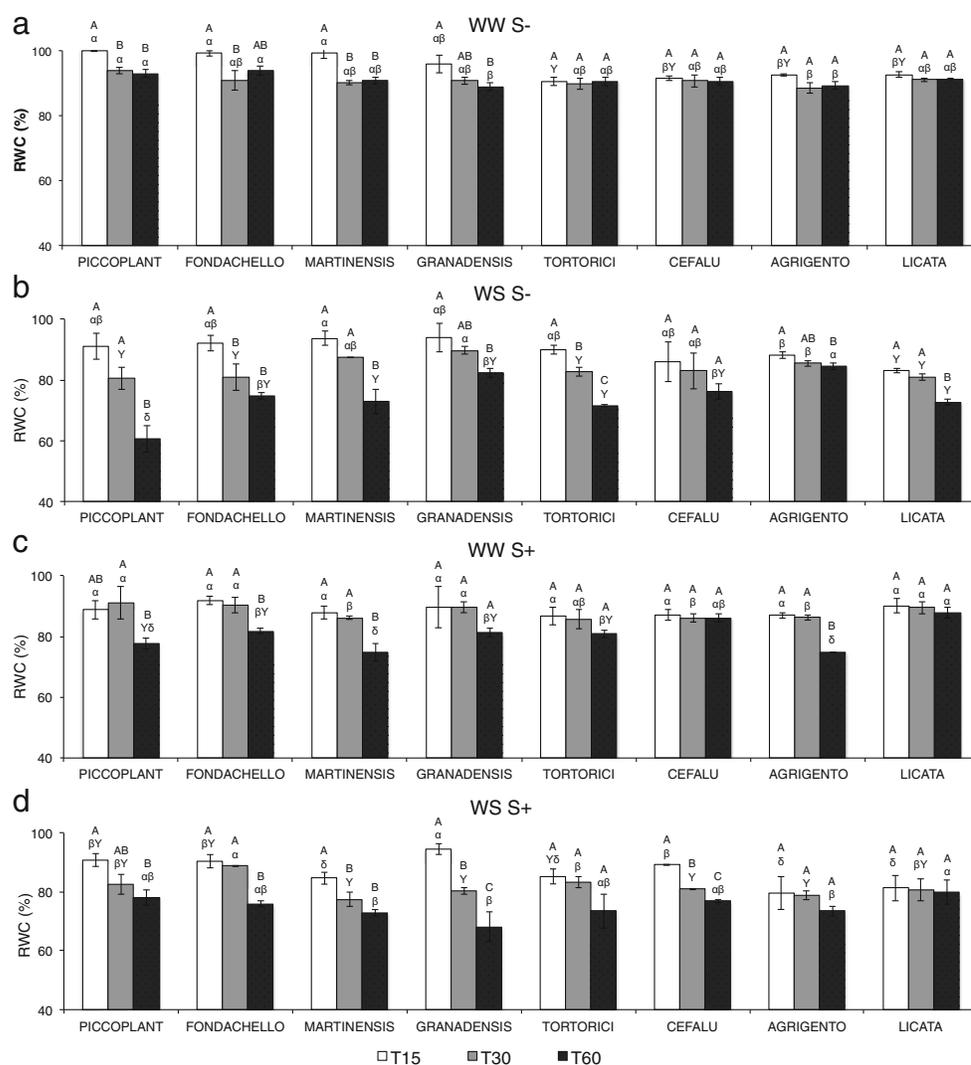


Granadensis were less affected by both stresses and Fondachello was equally affected by S, WS and both stresses. The effect of both stresses was notable at T45 in some clones. Although clones seemed to be more affected by WS than by S at T60, no significant differences between treatments were found in Martinensis, Granadensis and Tortorici.

*Relative Water Content (RWC)*

Significant differences at T0 ( $P=0.004$ ) were found between clones, with Fondachello and Granadensis having the highest and lowest values of RWC, respectively (Fig. 2). A trend of decreasing RWC was found in most of the eight clones of

**Fig. 2** Changes in relative water content (RWC) during T15, T30 and T60 in each clone for each treatment [WW S- (**a**); WS S- (**b**); WW S+ (**c**) and WS S+ (**d**)]. Data are the means of three replicates and the standard errors (*SE*) are shown when larger than the symbols. Data were analysed with an ANOVA Tukey analysis. Different capital letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ) between time for the same clone and treatment. Different Greek letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ) between clones for the same time and treatment



giant reed subjected to stress over the experiment, although the differences were not significant in some clones. Significant differences were found between treatments and time ( $P<0.0001$  in each case). The decrease in RWC in WS treatments was greater than under WW S+. WW S- resulted in a higher RWC than WW S+, but the RWC under WS S- and WS S+ were not significantly different. Moreover, a significant decrease was observed for each time (T15, T30 and T60) in relation to T0.

Each clone sustained a decrease in RWC under WS S- (Fig. 2b) except Cefalú, where no significant differences were found ( $P=0.469$ ). At T60, the RWC of Piccoplant decreased by 37.9 %, while in Agrigento and Granadensis it decreased by only 13.5 and 15.7 % with respect to the values at T0. Some clones (Granadensis, Tortorici, Cefalú and Licata) did not show a significant decrease in RWC throughout the WW S+ treatment (Fig. 2c), while the decrease in other clones (Piccoplant, Fondachello, Martinensis and Agrigento) was significant only at T60. Agrigento and Martinensis showed a

greater decrease at T60 with respect to T0 (with 23.4 % for both), whereas Licata and Cefalú only decreased by 10.2 and 11.8 %, respectively. A similar pattern was observed for the WS S+ treatment in some clones (Tortorici, Agrigento and Licata), where no significant differences were found over time (Fig. 2d). Others, such as Piccoplant, Fondachello, Martinensis, Granadensis and Cefalú, showed a decrease in RWC to some extent. Granadensis was the clone with the greatest decrease relative to T0, whereas Licata had the smallest decrease (30.3 and 18.2 %, respectively). Significant and positive linear correlations were found between  $A_{sat}$  and  $g_s$  and RWC throughout the experiment ( $R^2=0.688^{**}$  and  $R^2=0.636^{**}$ , respectively).

### Chlorophyll Content

A decrease was observed in all treatments relative to the control at T60, being most important in treatments involving WS

(22.9 % in WS S- and 21.9 % in WS S+), whereas *S* treatment decreased only 14.2 % with respect to the control.

Piccoplant, Fondachello and Cefalù underwent a decrease in chlorophyll content under WW S- between T0 and T60 (ESM 2). At T60, significant differences were found between treatments in each clone. A smaller decrease in chlorophyll content was observed under WW S+ than under WS S- and WS S+. Fondachello, Granadensis, Cefalù, Agrigento and Licata showed a similar pattern between WS S- and WS S+, while Piccoplant, Tortorici and Martinensis were more affected by WS S- than by WS S+. Relative to their own chlorophyll content at T0, Cefalù was the most affected by WS S- and WS S+, decreasing by 45.2 and 44.5 %, respectively, while Agrigento was the most affected by *S* (WW S+), decreasing by 34.2 % at T60, and was also the clone with the lowest chlorophyll content values in that treatment (ESM 2). Positive and significant correlations were found between chlorophyll content and  $A_{\text{sat}}$  (0.459\*\*), SLA (0.541\*\*) and TDW (0.453\*\*) (ESM 3).

### Biomass Parameters

In general, NS was affected by the treatments, especially WS S+ relative to WW S-. Only three clones (Tortorici, Cefalù and Agrigento) showed differences between treatments, although no significant differences were observed in the other clones (Table 2). Plant height (H; cm) and stem diameter (SD; cm) were different according to the treatment, being higher under WW S- ( $73.0 \pm 4.0$  and  $0.7 \pm 0.02$ , respectively) than under the other treatments. A greater decrease in H and SD was observed in WS S- ( $54.2 \pm 3.5$  and  $0.6 \pm 0.02$ , respectively) and WS S+ ( $48.7 \pm 3.5$  and  $0.6 \pm 0.02$ , respectively) than in WW S+ ( $59.2 \pm 3.9$  and  $0.63 \pm 0.03$ , respectively).

Parameters related to leaf development, such as NL, gLA, GLP, DLP and TDW were more affected by WS S- and WS S+ than by WW S+ (Table 2). gLA was reduced significantly in each treatment with respect to the control, but there were no significant differences between WS S- (84.2 %) and WS S+ (80.8 %). Martinensis and Fondachello showed the lowest values in WW S-. Under WS S- conditions, Cefalù had the largest decline (92.8 %), followed by Tortorici (89.9 %), Licata (86.4 %) and Piccoplant (86.2 %), whereas the smallest decline was observed in Granadensis (78.3 %) and Agrigento (74.9 %). Tortorici and Agrigento were the most affected by WW S+ (70.8 and 68.8 %, respectively), whereas Cefalù and Martinensis were the least affected (59.4 and 47.7 %, respectively). Licata was most affected by both stresses (WS S+), with a reduction of 88.8 %, followed by Cefalù (88.1 %) and Agrigento (86.5 %), whereas Piccoplant, Granadensis and Martinensis were less affected (73.2, 73.0 and 66.1 %, respectively). TDW (Fig. 3) declined by 61.5 and 66.3 % in WS S- and WS S+, respectively, whereas WW S+ decreased by only 45.8 %, relative to the control treatment (Fig. 3).

In general, the shoot/root ratio (S/R,  $\text{g g}^{-1}$ ) decreased in each treatment in comparison to the control, being the lowest in the *WS* treatment compared to the combined stresses or *S* alone (Table 3). Moreover, the decrease in the S/R was due to a differential response to stress between shoots and roots. While shoot growth seemed to be more affected by *WS* relative to the control (69.1 % for WS S-, 49.7 % for WW S+ and 71.3 % for WS S+), root growth seemed to be less affected (34.7 % for WS S-, 43.1 % for WW S+ and 50.1 % for WS S+), although no significant differences were found in a Tukey test between treatments (except for the control) (Table 3). Even so, the S/R data should be considered carefully because our experiment utilised potted plants, where root development is influenced by the size of the pots. Licata and Granadensis had the greatest decrease in the S/R under WS S- (71.4 and 69.1 %) relative to the control and Martinensis the smallest (34.7 %). The S/R was less affected by WW S+, with Piccoplant and Granadensis being the most affected, with 28.6 and 27.4 % reductions, respectively, compared to the control. Both Martinensis and Cefalù showed increases in their S/R under this treatment (WW S+) relative to the control (21.8 and 3.7 %, respectively). WS S+ had similar effects on some clones as WS S- [Piccoplant (52.1 %), Granadensis (64.7 %), Tortorici (41.0 %)], although other clones [Licata (40.6 %), Fondachello (34.6 %), Agrigento (26.3 %) and Martinensis (12.9 %)] were less affected by both stresses than *WS* alone.

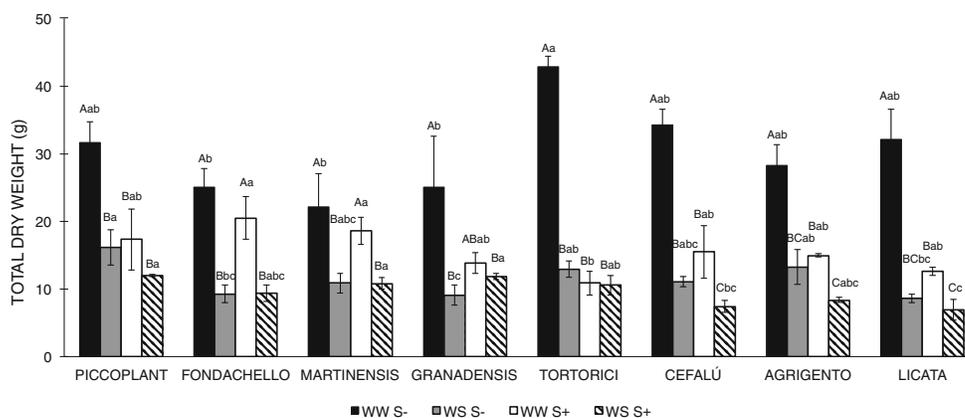
*WS* had an important influence on the LAR and LWR, which decreased 58.4 and 40.9 % with respect to the control under WS S- and by 45.9 and 24.3 % under WS S+ (Table 3). In contrast, WW S+ decreased these parameters by only 32.7 and 13.2 %, respectively (Table 3). Similar to LAR and LWR, the SLA was more affected by treatments involving *WS* (31.6 % in WS S- and 28.2 % in WS S+) than *S* (24.0 %). A strong and positive correlation (ESM 3), was found between SLA and  $A_{\text{sat}}$  (0.736\*\*) and between SLA and chlorophyll content (0.541\*\*) (Bilateral significance at level  $P < 0.01$ ).

## Experiment 2: Screening for Increasing Salinity Levels

### Gas Exchange

No significant differences were observed for  $A_{\text{sat}}$  between UNICT S0 and UNICT S4 at the initial time ( $T_i$ ) in Fondachello and Agrigento (Fig. 4a). A decrease in the  $A_{\text{sat}}$  was found in Tortorici and Licata ( $P = 0.001$ ), although a surprising increase was found in Cefalù from  $20.5 \pm 1.0$  to  $32.5 \pm 1.0$ . Moreover, a decrease in  $g_s$  was observed in each clone ( $P = 0.001$ ) except Cefalù, which had an increase of 18.9 % in  $g_s$  between UNICT S0 and UNICT S4 at  $T_i$ . On the other hand, no significant differences were found in  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  between UB S0 and UB S16 at  $T_i$  in any clone studied (Fig. 4b). A decrease in  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  was found between





**Fig. 3** Changes in total dry weight (TDW, g) at T60 in each clone for each treatment (WW S-, WS S-, WW S+ and WS S+). Data are the means of three replicates and the standard errors (*SE*) are shown when larger than the symbols. Data were analysed with an ANOVA Tukey analysis.

Different capital letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments for a same clone and different small letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between clones for the same treatment

UNICT S0 and UNICT S4 at the end of the experiment (Tf) in each clone except in Cefalú, where there was no significant difference found in  $A_{\text{sat}}$  (Fig. 4a). Significant differences were also found in each clone in both parameters between UB S0 and UB S16 at Tf (Fig. 4b).

*S* treatment at Tf led to lower values of  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  at UB than at UNICT. A decrease in  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  was found in each clone in *S* treatments (S4 and S16) in both locations (Fig. 4a, b), except for Fondachello at UNICT, where there was no significant difference found in  $A_{\text{sat}}$  ( $P = 0.809$ ) and an increase of 32.8 % in  $g_s$  was observed.

Regarding the differences between clones, significant differences were found between them for  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  in most of the treatments. At Tf, Fondachello had the highest  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  values at UNICT S4 ( $22.7 \pm 0.1$  and  $0.203 \pm 0.004$ , respectively), followed by Cefalú and Agrigento. Cefalú had the highest  $A_{\text{sat}}$  value at UB S16 ( $7.6 \pm 1.0$ ), followed by Fondachello ( $5.0 \pm 0.2$ ), with the latter having higher  $g_s$  values ( $0.046 \pm 0.002$ ) than Cefalú ( $0.020 \pm 0.001$ ).

#### Chlorophyll Content

Different behaviour was observed between locations with respect to chlorophyll content (ESM 4). An increase in chlorophyll content was observed in almost every clone at UNICT, except for Tortorici, which had no significant differences between treatments (S0 and S4) ( $P = 0.630$ ). Nevertheless, a decrease in chlorophyll content was observed between UB S0 and UB S16 in each clone. Cefalú had the lowest chlorophyll content at UNICT S0, whereas Fondachello, Tortorici and Licata had the highest chlorophyll content at UB S0 (ESM 4a, b). Under the *S* treatment, Agrigento and Fondachello had the highest chlorophyll content values at UNICT S4, whereas Fondachello and Cefalú showed the highest values at UB S16. The Agrigento clone

behaved differently at the two locations, showing the greatest increase between UNICT S0 and UNICT S4 (14.8 %) and the greatest decrease between UB S0 and UB S16 (23.9 %).

#### Biomass Parameters

No significant differences were found in the gLA (Fig. 5a) in most of the clones between UNICT S0 and UNICT S4, except for Agrigento (a decrease of 58.5 %). Surprisingly, an increase in gLA was found in Fondachello (10.6 %) and Licata (25.0 %). In addition, a remarkable decrease in gLA was observed at UB (Fig. 5b), being most noticeable in Tortorici (70.8 %), while Fondachello had the smallest decrease in gLA between UB S0 and UB S16 (46.7 %).

No significant differences were found in TDW (Fig. 5a) between UNICT S0 and UNICT S4 in the majority of clones, apart from Licata, whereas significant differences were found between UB S0 and UB S16 in all clones except Fondachello. The TDW (Fig. 5b) was lower at UB, even in the control treatment (S0). Fondachello had the highest production in both locations.

In relation to the S/R a decrease between control and *S* treatment was observed although no significant differences were found between treatments or even between clones (Fig. 5a, b). However, lower values of S/R were observed at UNICT for each clone than at UB. Tortorici had the highest S/R value at UNICT S4, while the highest value in UB S16 was found in Fondachello.

The behaviour of SLA was opposite to S/R (Fig. 5a, b), with no significant differences being observed between treatments (except for Licata at UNICT) or between clones in the same location. However, a tendency for SLA to decrease in line with increasing *S* was observed (except for Licata at UNICT). Moreover, lower SLA values were found at UB than at UNICT.

**Table 3** Biomass parameters in eight clones of *Arundo donax* L. (P, Piccoplant; F, Fondachello; M, Martinensis; G, Granadensis; T, Tortorici; C, Cefalù; A, Agrigento; L, Licata) under four different treatments: (1) well watered with non-saline solution (WW S-), (2) low watered with non-saline solution (WS S-), (3) well watered with saline solution (WW S+) and (4) low watered with saline solution (WS S+) at T60. Means and

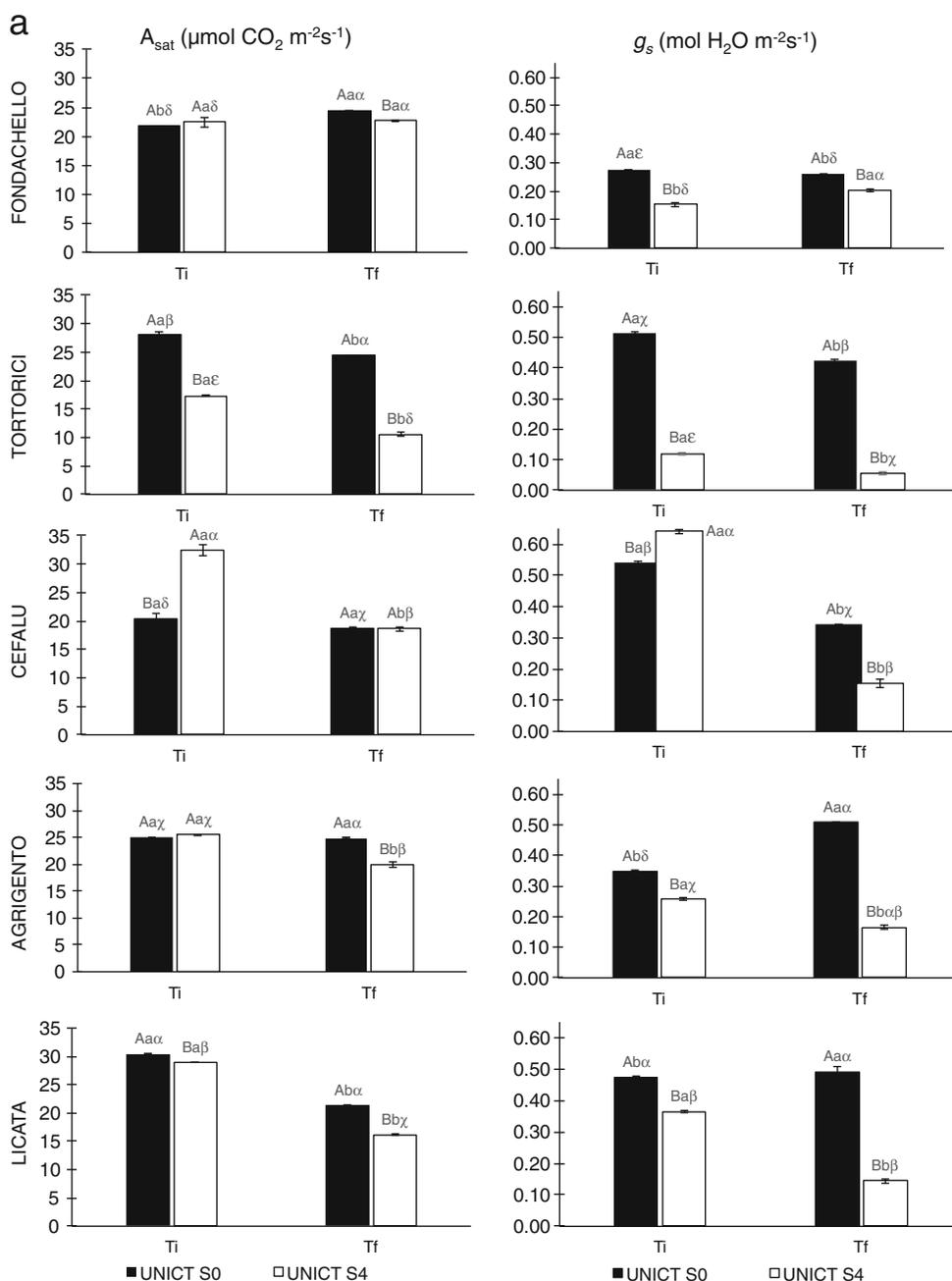
standard error (*SE*) are shown. Data were analysed with an ANOVA Tukey test between treatments (capital letters) and between clones (small letters). Shoot/root index (S/R,  $\text{g g}^{-1}$ ), specific leaf area (SLA,  $\text{m}^2 \text{Kg}^{-1}$ ), leaf area ratio (LAR,  $\text{m}^2 \text{Kg}^{-1}$ ) and leaf weight ratio (LWR,  $\text{Kg Kg}^{-1}$ )

		S/R ( $\text{g g}^{-1}$ )			SLA ( $\text{m}^2 \text{Kg}^{-1}$ )			LAR ( $\text{m}^2 \text{Kg}^{-1}$ )			LWR ( $\text{Kg Kg}^{-1}$ )		
		Mean	SE	Tukey	Mean	SE	Tukey	Mean	SE	Tukey	Mean	SE	Tukey
WW S-	P	4.26	0.15	Aab	21.9	0.84	Aab	7.3	0.29	Aab	0.34	0.00	Ab
	F	4.57	0.50	Aa	24.6	2.74	Aa	6.4	0.51	Aab	0.26	0.01	Ac
	M	3.26	0.25	Bab	19.8	1.79	Aab	6.8	0.73	Aab	0.34	0.02	Ab
	G	4.05	0.82	Aab	20.8	2.05	Aab	8.7	1.39	Aa	0.41	0.03	Aa
	T	3.17	0.30	Ab	18.7	0.61	Ab	5.8	0.47	Ab	0.31	0.02	Ab
	C	3.78	0.10	Aab	21.9	1.70	Bab	6.7	0.58	Aab	0.31	0.01	Ab
	A	3.34	0.58	Aab	19.9	1.09	Aab	6.2	0.62	Ab	0.31	0.01	Ab
	L	4.34	0.16	Aab	21.8	0.56	Aab	7.6	0.21	Aab	0.35	0.01	Ab
WS S-	P	2.13	0.10	Ca	13.9	2.49	Bab	2.2	0.60	Bb	0.15	0.02	Bb
	F	1.94	0.09	Cab	15.6	3.07	Aab	3.1	0.62	Bb	0.20	0.02	Aab
	M	2.13	0.49	Ca	13.3	1.20	Bab	2.7	0.55	Cb	0.20	0.04	Bab
	G	1.25	0.09	Bb	19.6	0.86	ABa	5.4	0.74	Ba	0.27	0.03	Ba
	T	1.60	0.03	Cab	13.0	4.19	Aab	1.9	0.71	Cb	0.15	0.01	Cb
	C	2.02	0.06	Cab	10.8	3.05	Ab	1.9	0.88	Bb	0.18	0.02	Bb
	A	1.91	0.54	Aab	17.0	1.39	Aab	3.1	0.74	Bb	0.19	0.03	Bb
	L	1.24	0.33	Cb	15.7	0.91	ABab	3.3	0.56	Cb	0.21	0.06	Bab
WW S+	P	3.04	0.15	Bab	17.7	0.64	ABab	5.3	1.04	Aabc	0.30	0.05	Aabc
	F	4.04	0.23	ABa	17.0	3.26	Aab	4.3	1.16	ABbc	0.25	0.02	Abc
	M	3.97	0.05	Aa	15.5	1.10	ABb	4.1	0.28	Bbc	0.27	0.00	ABabc
	G	2.94	0.53	Aab	1.78	1.26	ABab	6.1	0.64	ABab	0.34	0.03	ABab
	T	2.54	0.34	ABb	17.8	0.56	Aab	4.9	0.31	ABabc	0.27	0.01	Aabc
	C	3.92	0.18	Aa	19.3	0.62	Ba	6.8	0.60	Aa	0.35	0.03	Aa
	A	3.12	0.72	Aab	15.0	1.02	Ab	3.6	0.55	Bc	0.24	0.02	ABc
	L	3.60	0.46	Aab	19.5	1.06	ABa	6.1	0.29	Bab	0.31	0.02	Aab
WS S+	P	2.04	0.44	Cab	19.8	0.54	Aa	4.8	0.43	Aa	0.28	0.02	Aab
	F	2.99	0.62	BCba	15.1	0.15	Aa	3.9	0.57	ABab	0.26	0.04	Aab
	M	2.84	0.36	BCa	14.8	1.20	Ba	4.5	0.42	Bab	0.31	0.03	Aa
	G	1.43	0.18	Bb	15.9	0.90	Ba	4.5	0.51	Bab	0.29	0.05	Bab
	T	1.87	0.35	BCab	16.4	0.18	Aa	4.0	0.14	Bab	0.24	0.01	Bab
	C	2.61	0.32	Ba	17.1	1.90	Ba	3.9	0.97	Bab	0.22	0.01	Bab
	A	2.46	0.35	Aab	16.9	7.28	Aa	2.7	0.59	Bb	0.18	0.04	Bb
	L	2.58	0.29	Ba	14.9	2.73	Ba	4.1	0.51	Cab	0.29	0.05	ABab

### Experiment 1 and 2: Stress Susceptibility Index (SSI)

After carrying out the principal component analysis (PCA), it was observed that the first two principal components explained 72.04 and 82.60 % of variation. The most significant and positive parameters of component 1 (above 0.750) were selected: gLA, GLP, NL,  $A_{\text{sat}}$ ,  $g_s$ , LAR, TDW, RWC, SLA, SPAD and S/R (ESM 5), but only the common parameters in Experiment 1 and Experiment 2 ( $A_{\text{sat}}$ ,  $g_s$ , GLP, TDW, S/R, gLA, SLA) were used in the calculation of the SSI.

The eight clones of giant reed in Experiment 1 were classified according to SSI as shown in Fig. 6. Each axis represents the clone tolerance or sensitivity to stress [*WS* (X axis), *S* (Y axis) and both stresses (Z axis)]. A higher SSI indicates lower tolerance to stress. Agrigento was the most tolerant to *WS* (SSI=0.84), whereas its tolerance to *S* and both stresses was lower (1.08 and 1.00, respectively). Granadensis, Martinensis and Fondachello were also tolerant to *WS* (0.88, 0.92 and 1.01, respectively). However, Martinensis showed a higher tolerance to *S* (0.59) and both stresses (0.86) than



**Fig. 4 a** Changes in  $A_{sat}$  and  $g_s$  during Ti and Tf in each clone, respectively, for each treatment (UNICT S0 and UNICT S4). Values are the mean of three replicates  $\pm$  standard error (SE). Different capital letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments for the same location and time, different small letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between time for a same location and treatment, and different Greek letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between clones for the same treatment and location. **b** Changes in  $A_{sat}$  and  $g_s$  at UB during Ti

and Tf in each clone, respectively for each treatment (UB S0 and UB S16). Values are the mean of three replicates  $\pm$  standard error (SE). Different capital letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments for the same T, different small letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between T for the same treatment and different Greek letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between clones for the same treatment

Fondachello (0.92 and 1.01) and Granadensis (1.18 and 1.06, respectively). Moreover, Martinensis and Cefalú showed low SSI values in the *S* treatment (0.59 and 0.68, respectively), indicating a high tolerance to this stress. However, Cefalú's tolerance to *WS* and both stresses was significantly lower (1.11 and 1.00, respectively).

Martinensis, Piccoplant and Tortorici showed high tolerance to both stresses (0.86, 0.89 and 0.97, respectively), whereas Piccoplant's tolerance to *WS* was not noticeable (1.04). Martinensis seemed to have performed quite well under *WS*, *S* and both stresses, showing low SSI values in each treatment (0.92, 0.59 and 0.86, respectively). In contrast, the

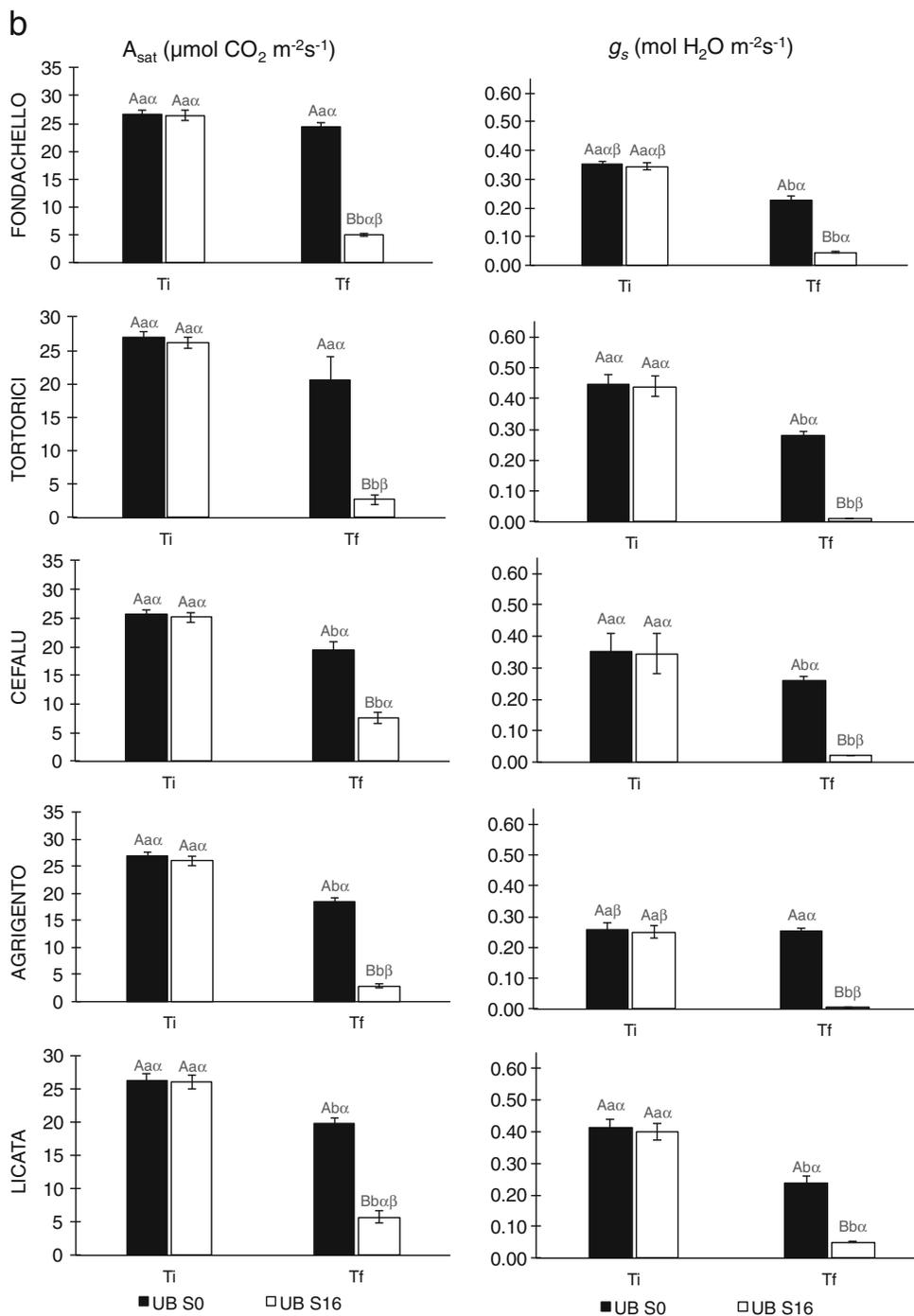
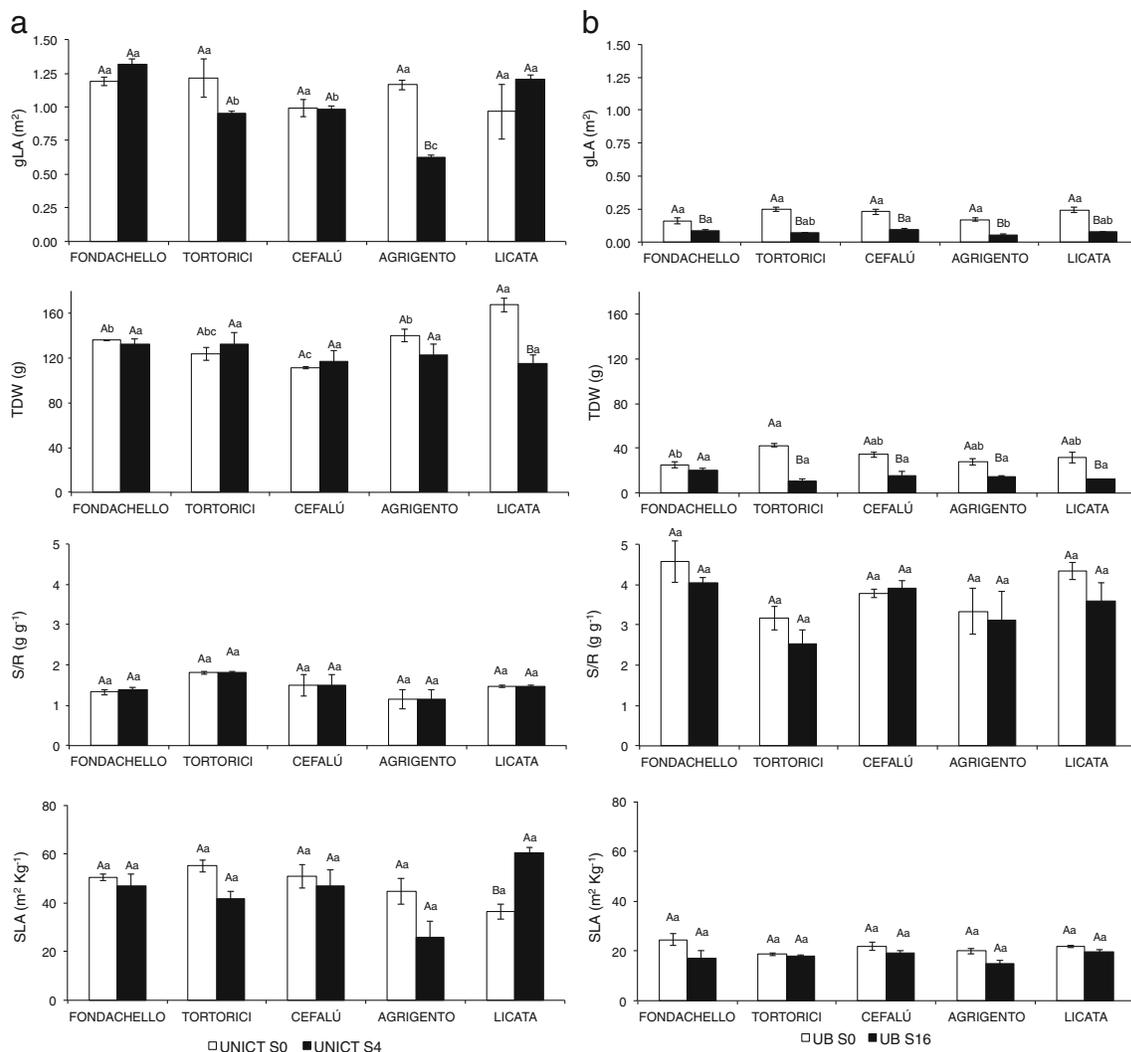


Fig. 4 continued.

results for Licata indicate a poor response to stress with high SSI values for almost every treatment (1.09, 1.05 and 1.12, for WS, S and double stress, respectively).

A linear correlation was calculated in order to check the existence of a relation between stress and the altitude of the area where the clones were collected (ESM 6). No strong relation was found except for S, with a Pearson correlation coefficient of  $-0.783$ , although it was non-significant ( $P=$

$0.065$ ). In relation to increasing S levels, Fondachello recorded the lowest SSI for UNICT S4 (0.55), followed by Cefalù (1.40) and Licata (1.44), with the same three clones having similar low SSI values for UB S16 (0.99, 0.71 and 0.99, respectively). On the other hand, Agrigento (2.87 and 1.18) and Tortorici (2.01 and 1.04) had the highest SSI values for the UNICT S4 and UB S16 treatments, respectively.



**Fig. 5** Differences in  $gLA$  ( $m^2$ ),  $TDW$  (g),  $S/R$  ( $g\ g^{-1}$ ) and  $SLA$  ( $m^2\ Kg^{-1}$ ) at  $T60$  in each clone and location (a; UNICT and b; UB) for each treatment (S0 and S4-S16). Values are the mean of three replicates  $\pm$  standard error (SE). Different capital letters indicate significant

differences ( $P < 0.05$ ) between treatments for the same location and clone. Different small letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between clones for a same location and treatment

## Discussion

### Salinity Effect on Plants

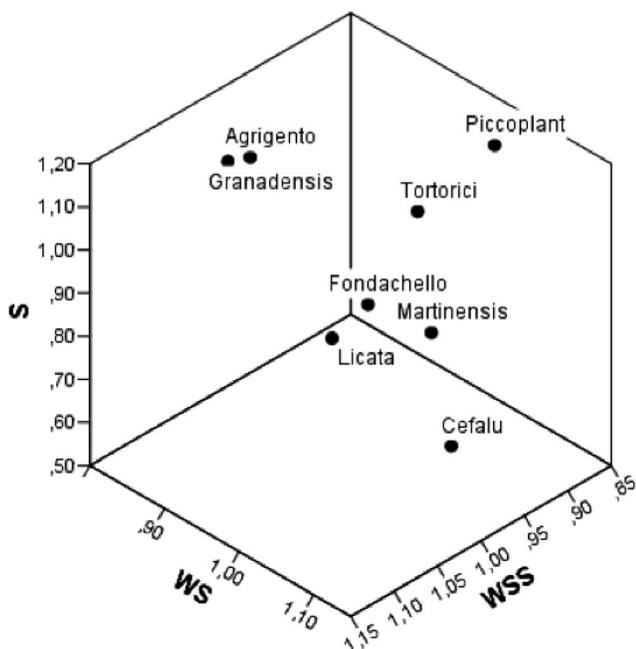
It has been reported that one of the major effects of salinity on plant performance is a decrease in photosynthetic rates [38]. In our experiments (1 and 2), decreases in  $A_{sat}$  and  $g_s$  were reported in almost all clones of giant reed as an effect of saline stress over time (Fig. 1) and at increasing salinity levels (Fig. 4).

The values of  $A_{sat}$  and  $g_s$  at  $T0$  (Exp. 1) and  $Ti$  (Exp. 2) were similar in the control treatments (WW S- and S0, respectively) across the giant reed clones even at different locations, with the  $A_{sat}$  values similar to those reported by Papazoglou et al. [39] and Nackley et al. [27].

The earlier decrease in  $g_s$  than in  $A_{sat}$  that was observed in Experiment 1 (Fig. 1) and Experiment 2 (Fig. 4) in most of the

clones (except Fondachello) is supported by the findings of Centritto et al. [40], Munns and Tester [6] and Yousfi et al. [41], where one of the earliest responses to moderate stress is a decrease in stomatal conductance in order to reduce water loss. This is reflected in our study with the strong and positive correlation between both parameters ( $A_{sat}$  and  $g_s$ ) and the negative correlation of both parameters over time (ESM 1). Moreover, as shown by Cornic and Massacci [42], the positive relation between  $A_{sat}$ ,  $g_s$  and RWC indicates a decrease in RWC over time due to  $S$  (Fig. 2c). Even though there are few studies on the effects of salinity on photosynthesis in giant reed, similar observations of decreasing  $g_s$  after a stress period have been observed in other  $C_3$  plants exposed to salinity, such as wheat [41] and olive [40].

The fact that the chlorophyll content decreased in one location (UB) under salinity and increased in the other location



**Fig. 6** 3-D graphic representing stress susceptibility index (SSI) of each clone according to water stress ( $WS$ ; X axis), salinity ( $S$ ; Y axis) and both stresses ( $WSS$ ; Z axis). Higher SSI values indicate lower tolerance to stress

(UNICT) (ESM 4) does not help to clarify the effect of salt on chlorophyll content. Santos [43] reported that saline stress decreased chlorophyll content even at low concentrations. Although our data from UNICT do not support that finding (ESM 4), the high levels of  $A_{\text{sat}}$  and TDW in the salinity treatment (UNICT S4 similar to UNICT S0 at Tf) (Figs. 4 and 5) would suggest a small amount of damage to the photosynthetic capacity at mild salinity level. However, a higher salinity dose resulted in a decrease in chlorophyll content in giant reed plants, as observed at UB in Experiment 1 (ESM 2) and Experiment 2 (ESM 4).

The effect of salinity on plant performance implicates a decrease of growth parameters such as  $H$ ,  $NL$ ,  $NS$ ,  $gLA$ , TDW and indices such as  $S/R$ ,  $SLA$  and  $LAR$ , not only in high salinity levels (Tables 2 and 3, Figs. 3 and 5), but also in low salinity levels (Fig. 5) as a consequence of changes in elongation rates due to leaf water status [44]. A decrease of leaf growth after an increase in soil salinity is primarily due to the osmotic effect of the salt around roots, producing a transient loss of water in leaf cells, which becomes more important over time [6] and produces similar effects to drought in salt-tolerant plants [8]. Not only were decreases in shoot mass observed, there also was a reduction of leaf development at the end of the experiment, in accordance with reports by Liu and Stützel [12], Munns [8] and Munns and Tester [6]. A reduction in plant size ( $gLA$ ) relative to root growth would decrease the water use by plants, thus allowing conservation of soil moisture and preventing an increase in the salt concentration of the soil. Therefore, a decrease in the plant size could

be a major strategy for injury reduction under stress [6, 12, 45]. A possible reason for a lower biomass production (TDW) at UB than at UNICT (Table 3) could be due to the use of smaller pots (5.0 vs 9.5 L) that limited root development, as observed by a lower value of the  $S/R$  at UNICT.

On the contrary, in plants with high salt uptake rates, the oldest leaves may start showing symptoms of injury. A higher rate of leaf death than formation of new leaves will mean that the photosynthetic capacity of the plant will no longer be able to supply the carbohydrate requirements of young leaves, reducing their growth rate. Therefore, giant reed seems to be a salt-resistant plant according to the high  $GLP$  and  $S/R$  values in the salinity treatment, as observed in Experiment 1 (Tables 2 and 3), and it decreases in biomass production (TDW) only at high levels of  $S$ , as seen in Experiment 2 (Fig. 5). It is worth noting that the salinity level used in Experiment 1 (16  $mS\ cm^{-1}$ ) has been considered as “severe” in other crops such as durum wheat [41], but similar salinity levels have been used in other studies with giant reed and saline wastewater [29, 46].

One of the traits of salt tolerance in crops suitable for large scale evaluation in greenhouses is ion ‘exclusion’ [47], which is defined as the ability to restrict the rate of entry of potentially toxic  $Na^+$  and  $Cl^-$  into the shoots combined with the maintenance of  $K^+$  uptake, even when the  $Na^+/K^+$  ratio is very high in the soil solution [48]. Rossa et al. [26] studied concentrations of  $K^+$ ,  $Na^+$  and  $Cl^-$  ( $mmol\ kg^{-1}\ DM$ ) in leaves of different ages in giant reed and reported a high content of  $K^+$  along shoots (from 351.6 to 441.4  $mmol\ kg^{-1}\ DM$ , from bottom to top), and a decreasing trend of  $Na^+$  and  $Cl^-$  along the shoot (from 163 to 20.8 and from 370.2 to 163.5  $mmol\ kg^{-1}\ DM$ , from bottom to top, respectively). Ball and Farquar [49] and Ball et al. [50] mentioned that plants in saline environments require a high  $K^+$  concentration for efficient photosynthesis performance, especially for the operation of PSII. Although more studies are needed to confirm this hypothesis, it is likely that high  $K^+$  content and low rate of  $Na^+$  and  $Cl^-$  transport to leaves [8] with increasing plant height may occur in saline conditions, probably explaining the high tolerance of giant reed to salinity.

### Water Stress Effects

It has been widely described that water stress induces a decrease in photosynthetic rates [51, 9]. Decreases in  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  were reported for all clones of giant reed as an effect of water scarcity (Figs. 1 and 4). Giant reed clones showed a higher rate of assimilation in the control treatment, and Mann et al. [23] found similar significant decreases in  $CO_2$  assimilation in drought treatments in giant reed, reducing  $CO_2$  assimilation to 4–10 % relative to controls. One of the earliest responses to water stress is a decrease in stomatal conductance [52] as a way of decreasing transpiration and water loss from leaves. At the same time, a

decrease in the CO<sub>2</sub> diffusion into leaves is produced, reducing internal CO<sub>2</sub> partial pressure, and consequently, reducing photosynthetic rates, as observed by Li et al. [53] in wheat. In our study, decreases in photosynthesis rates ( $A_{\text{sat}}$ ) are associated with reductions in stomatal conductance ( $g_s$ ), as shown by the strong and positive correlation between both parameters (ESM 1), as previously observed by Flexas et al. [52].

Decreases in RWC observed in Experiment 1 in giant reed as a consequence of *WS* (Fig. 2b), might indicate a loss of cell turgor. Cornic and Massacci [42] showed that photosynthetic biochemistry is significantly affected only when leaf water deficit reaches 30 %. Therefore, giant reed should not have experienced damage to its photosynthetic machinery. Chlorophyll contents (ESM 2) decreased in water stress treatment relative to the control, due to an increase in chlorophyll degradation or a decrease in chlorophyll synthesis. A positive and significant correlation was found between chlorophyll content and  $A_{\text{sat}}$  and TDW even though measurements were made in completely mature leaves, although young ones. We believe that a stronger correlation would have been found if chlorophyll content had been measured in the oldest leaves, and this could be used as a screening criterion for plants under water stress and salinity, as proposed for barley by Rong-Hua et al. [54] and for wheat by Munns and James [47].

Giant reed growth was substantially affected by water stress, as indicated by large decreases in parameters such as H, NL, NS, gLA, TDW, S/R, SLA and LAR (Tables 2 and 3, Fig. 3). In addition, a decrease in the SLA (Table 3) was observed with respect to the control, indicating that leaves became smaller and thicker, in order to be more efficient for controlling water losses under water stress conditions [13]. Large decreases in shoot DM compared with root DM were observed under water stress, in accordance with Blum [45] and Munns and Tester [6]. The values of the S/R in control and water stress treatment as well as the S/R reduction (%) under water stress treatment relative to the control (Table 3) were slightly lower than those obtained by Mann et al. [23], reaching 4.34 and 2.13 g g<sup>-1</sup> (control and severe drought treatment, respectively) and 49–60 %, respectively.

In general, giant reed has been classified as a perennial rhizomatous grass with a high biomass yield in field conditions [25, 26, 55, 56]. However, the TDW was affected by water stress due to dehydration (Fig. 3). This biomass yield of giant reed under water stress was slightly larger than the results of Mann et al. [23], where only 21–28 % of the biomass of the control plants was produced under drought stress. In semi-arid Mediterranean field conditions, Cosentino et al. [19] concluded that giant reed grown in deficit irrigation (e.g., 50 % ET<sub>m</sub> restitution) not only conveyed to relevant biomass yield (reduction of up to 13.7–21.9 % with respect to the maximum achieved), but allowed a savings of more than 50 % of irrigation water. In conditions of low soil water availability, giant reed was able to improve its water use efficiency

and to maintain a high level of biomass production. Nevertheless, it is difficult to compare our data with data obtained from other giant reed experiments carried out in field conditions, where the growth of rhizomes and roots is not limited by the pot size.

### The Effect of Both Stresses

Both stresses together affected  $A_{\text{sat}}$  and  $g_s$  in the same way that they were affected by water stress or salinity stress separately, although no significant differences were found between stress treatments at the end of the experiment (T60) (Fig. 1). Despite the lack of significant difference between clones at T60, there are significant differences after shorter stress durations, highlighting that the duration of stress is a critical factor.

The significant decrease in the RWC (Fig. 2d) and chlorophyll content (ESM 2) in stresses where water stress was involved indicates that giant reed seems to be more affected by water stress than by salinity. A similar pattern was observed for the growth parameters (H, NL, NS, gLA, TDW, S/R, SLA and LAR), confirming this hypothesis. However, the significant and positive correlation found between  $A_{\text{sat}}$  and SPAD, SLA and TDW in Experiment 1 (ESM 3) shows how these parameters could be used to determine the degree of stress encountered by the plant.

### Stress Susceptibility Index (SSI)

According to our results, Agrigento seems to be a suitable clone for cropping in Mediterranean areas under *WS* conditions, due its smaller decrease in  $A_{\text{sat}}$  (Fig. 1), RWC (Fig. 2b) and gLA (Table 2). Useful characteristics under *WS* were also observed for parameters such as chlorophyll content and gLA, among others, with this clone having the lowest SSI value (Fig. 6). In contrast, Martinensis seems to be the most salt tolerant clone in Experiment 1, making it suitable for cultivation in marginal lands where salinity may predominate. Its smaller decrease in  $A_{\text{sat}}$  (Fig. 1) and gLA (Table 2) ensured that this clone had the lowest SSI value against salinity (Fig. 6), followed by Cefalú and Fondachello. In order to have a successful and constant performance and obtain a substantial biomass yield, which is the main objective of growing PRG, we propose Martinensis and Piccoplant as the most suitable clones for growing under both stress conditions for biomass production. This result has important implications for the agronomy of these plants in marginal lands. Fondachello seems to be the most tolerant to increasing salinity levels according to the results of Experiment 2, followed by Cefalú and Licata (ESM 6), and this confirmed the low tolerance of Agrigento and Tortorici to salinity. However, considering the projected future effects of climate change, it is important to focus on giant reed clones that perform well under both stresses. In our case, with plants grown under greenhouse

conditions, the clones with the better results for both salinity and water stress were *Martinensis* and *Piccoplant* (Fig. 6).

## Summary

Our findings clearly indicate that:

- 1) In general, giant reed might be more tolerant to salinity than to water stress.
- 2) Salinity and water stress mainly affect stomatal conductance ( $g_s$ ), generating stomatal closure in order to prevent dehydration of the plant, and consequently decreasing photosynthesis.
- 3) There was a differential response to salinity and water stress among the eight ecotypes of giant reed, with the most water stress-resistant ecotype being *Agrigento* and the most salinity-resistant ecotypes being *Martinensis* and *Cefalù*.
- 4) *Fondachello*, *Cefalù* and *Licata* were the most salinity-resistant ecotypes in relation to increasing salinity levels.
- 5) In order to benefit from a constant performance and to obtain a maximised yield of biomass, which is the main objective of growing PRG, we propose *Martinensis* and *Piccoplant* as the most suitable ecotypes for growing in both stress conditions for biomass production.

However, it is important to note that this screening against salinity and water stress was performed under greenhouse conditions in pots, where the growth and behaviour of plants might be different than in field conditions. On the other hand, we have imposed a high level of stress, which will be rare under field conditions, but this approach was used to physiologically characterise the behaviour of giant reed under adverse conditions. The gain in knowledge of the behaviour of giant reed under stress conditions (similar to those in marginal lands) will assist in the establishment of this energy crop and the development of this type of renewable energy.

Furthermore, given the tolerance that giant reed seems to have to salinity in general, it would be interesting to study in more depth the behaviour of these species under saline conditions, and to analyse, for example, the content of  $K^+$  and  $Na^+$  in the different plant's organs, in order to understand the mechanism of salt tolerance of giant reed.

**Acknowledgments** We acknowledge the support of OPTIMA project (Optimization of perennial grasses for biomass production in the Mediterranean area, Grant Agreement no. 289642) and CONICYT (Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología) BecasChile 72120250 grant for financial support to ES.

**Author Contribution** Study conception and design: ES, DS, SC, SN; Acquisition of data: ES, DS, GL, CA; Analysis and interpretation of data: ES, DS, SN; Drafting of manuscript: ES; Critical revision: DS, SC, SN.

## References

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2012) FAO Statistical Yearbook 2012: World food and agriculture. Available at [http:// http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/i2490e.pdf](http://http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/i2490e.pdf) (accessed 12 March 2014)
2. Wilhelm C (2014) Salt stress resistance—multisite regulation in focus. *J Plant Physiol* 171:1. doi:10.1016/j.jplph.2013.11.001
3. IPCC (2013) Summary for policymakers. In: Stocker TF, Qin D, Plattner G-K, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM (eds) Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report for the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge
4. Cosentino SL, Testa G, Scordia D, Alexopoulou E (2012) Future yields assessment of bioenergy crops in relation to climate change and technological development in Europe. *Ital J Agron* 7, e22. doi: 10.4081/ija.2012.e22
5. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013) FAOSTAT. Agri-Environmental Indicators. Available at [http:// faostat3.fao.org](http://faostat3.fao.org) (accessed 05 March 2014)
6. Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59:651–681. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
7. Araus JL, Bort J, Steduto P, Villegas D, Royo C (2003) Breeding cereals for Mediterranean conditions: ecophysiological clues for biotechnology application. *Ann Appl Biol* 142:129–141. doi:10.1111/j.1744-7348.2003.tb00238.x
8. Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 25:239–250. doi:10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x
9. Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot* 103:551–560. doi:10.1093/aob/mcn125
10. Flexas J, Diaz-Espejo A, Galmés J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbo M (2007) Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in  $CO_2$  concentration around leaves. *Plant Cell Environ* 30:1284–1298. doi:10.1111/j.1365-3040.2007.01700.x
11. Lawlor DW, Cornic G (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ* 25:275–294. doi:10.1046/j.0016-8025.2001.00814.x
12. Liu F, Stützel H (2002) Leaf expansion, stomatal conductance, and transpiration of vegetable amaranth (*Amaranthus* sp.) in response to soil drying. *J Am Soc Hortic Sci* 127:878–883
13. Erice G, Louahlia S, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz M, Avicé JC (2010) Biomass partitioning, morphology and water status of four alfalfa genotypes submitted to progressive drought and subsequent recovery. *J Plant Physiol* 167:114–120. doi:10.1016/j.jplph.2009.07.016
14. Grzesiak MT, Waligórski P, Janowiak F, Marcińska I, Hura K, Szczyrek P, Głąb T (2013) The relations between drought susceptibility index based on grain yield ( $DSI_{GY}$ ) and key physiological seedling traits in maize and triticale genotypes. *Acta Physiol Plant* 35:549–565. doi:10.1007/s11738-012-1097-5
15. U.S. Energy Information Administration (2013) International Energy Outlook (DOE/EIA-0484). Available at [http://www.eia.gov/forecasts/ieo/pdf/0484\(2013\).pdf](http://www.eia.gov/forecasts/ieo/pdf/0484(2013).pdf) (accessed 05 June 2014)
16. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2013) World Population Prospects: The 2012 revision, highlights and advance tables. Working Paper No. ESA/P/WP.228
17. Mantineo M, D'Agosta GM, Copani V, Patanè C, Cosentino SL (2009) Biomass yield and energy balance of three perennial crops



- salinity in C<sub>3</sub> plants. *Plant Biol* 6:269–279. doi:[10.1055/s-2004-820867](https://doi.org/10.1055/s-2004-820867)
53. Li F, Kang S, Zhang J (2004) Interactive effects of elevated CO<sub>2</sub>, nitrogen and drought on leaf area, stomatal conductance, and evapotranspiration of wheat. *Agr Water Manage* 67:221–233. doi:[10.1016/j.agwat.2004.01.005](https://doi.org/10.1016/j.agwat.2004.01.005)
54. Rong-Hua L, Pei-pol G, Baumz M, Grando S, Ceccarelli S (2006) Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. *Agric Sci China* 5:751–757. doi:[10.1016/S1671-2927\(06\)60120-X](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(06)60120-X)
55. Angelini LG, Ceccarini L, Bonari E (2005) Biomass yield and energy balance of giant reed (*Arundo donax* L.) cropped in central Italy as related to different management practices. *Europ J Agronomy* 22:375–389. doi:[10.1016/j.eja.2004.05.004](https://doi.org/10.1016/j.eja.2004.05.004)
56. Nassi Di Nasso N, Roncucci N, Triana F, Tozzini C, Ragolini G, Bonari E (2011) Productivity of giant reed (*Arundo donax* L.) and miscanthus (*Miscanthus x giganteus* Greef et Deuter) as energy crops: growth analysis. *Ital J Agron* 6:141–147. doi:[10.4081/ija.2011.e22](https://doi.org/10.4081/ija.2011.e22)