

TESI DOCTORAL

ASSIMILACIÓ I GESTIÓ DEL CARBONI EN PLANTES  
DE CREIXEMENT LENT SOTMESES A CO<sub>2</sub> ELEVAT

Antoni Pardo Evangelista

Barcelona, juny de 2006





UNIVERSITAT DE BARCELONA



Facultat de Biologia

Departament de Biologia Vegetal

# ASSIMILACIÓ I GESTIÓ DEL CARBONI EN PLANTES DE CREIXEMENT LENT SOTMESES A CO<sub>2</sub> ELEVAT

Programa de Doctorat: *Biologia Vegetal*  
Bienni: 2000-2002

Memòria presentada per Antoni Pardo Evangelista per optar al grau de Doctor en Biologia

Vist-i-plau dels Directors

Dr. Joaquim Azcón Bieto

Dr. Robert Savé Montserrat

Dr. Salvador Nogués Mestres

Dra. Carmen Biel Loscos

Barcelona, juny de 2006



## AGRAÏMENTS

Les primeres paraules d'agraïment són pel meu pòquer de directors, els quals han fet possible aquesta tesi. El Dr. Joaquim Azcón em va introduir en el món de la fisiologia vegetal, i des d'aleshores no ha deixat de sorprendre'm i de transmetre'm entusiasme i inquietud. El Dr. Robert Savé (l'altre membre fundador d'aquest projecte), sempre eficaç, creatiu i elèctric, em va obrir les portes de l'ecofisiologia i ha estat disponible per tot el que he necessitat, que no ha estat poc. La Dra. Carme Biel ja exercia de directora abans de ser-ho oficialment. Haig d'agrair-li el seu suport incondicional i les rigoroses crítiques constructives. El Dr. Salvador Nogués va tenir la virtut d'integrar-se a la perfecció en aquest complex engranatge. Simplement m'ha donat allò que necessitava en el moment en què ho necessitava. Què més puc demanar? A tots els agraeixo la comprensió que m'han demostrat i la confiança que des del primer dia han dipositat en mi. Només espero no haver-los defraudat durant aquests anys que hem compartit.

Vull agrair a tots els professors i professores de la Unitat de Fisiologia Vegetal que m'hagin animat constantment a que acabés aquesta tesi: Henar Alegre, Isabel Fleck, Marta López, Maribel Trillas, Lluïsa Moysset, Carmen Bergareche, Dolors Vidal, Esther Simón, Ramon Vallejo, Assumpció Moret, Martí Nadal, Sergi Munné i Jaume Bech. Finalment, sembla que l'empenta ha funcionat.

Agraeixo al Josep Lluís Araus que m'hagi acollit al seu grup en aquesta darrera etapa. També a totes les persones de l'Equipo A: Eduardo Tambussi, Íker Aranjuelo, Llorenç Cabrera, Gemma Molero, Marta Lopes, Anna Febrero, Jordi Bort, Cristina Caldelas, Rubén Fernández, Diana Foix, Dolors Serret i Salima Yousfi. Especialmente a Santi de la Iglesia por la amistad que nos une desde hace muchos años.

A la Núria Gòmez pel seu ajut amb les mesures amb l'elèctrode d'oxigen, però sobretot per l'amistat i la complicitat que s'han generat al llarg d'aquests anys compartint grup de treball. Per extensió a la teva inseparable Elena Blanc. A l'Ígor Flórez per la seva espontaneïtat i frescura.

A la resta dels companys de la Unitat, per haver compartit molts bons moments: Tana Jubany, Eva Fernández, Sergi Viader, Lurdes Cotxarrera, Eva Casanova, Fagua Álvarez, Guillem Segarra, Núria Roca, Karen Peña, Zaida Muñoz, Tere Sauras, Pere Rovira, Joan Romanyà,

Carme Bladé, Monste Toribio, Jordi Torras, Luis López, Laia Vinyoles, Íker Hernández, Ricard Brossa, Cristina Agustí, Albert Xambó, Josep Benet. En especial a la Marta Pintó, perquè és tot un luxe poder dir que una persona de la teva qualitat humana és amiga meva. També vull agrair a les *secres* la seva eficiència i dedicació: M<sup>a</sup>Àngels, Mercè i Laura. I a la Carmen Cañueto per la seva amabilitat i l'afecte que sempre m'ha demostrat. I també a la Carmen Fernández Jurado. Moltes gràcies a tots.

Al Josep Matas del Servei de Camps Experimentals, pel teu rigor, pel suport que m'has donat i per tot el que m'has ensenyat. Al Jordi Matas per la seva predisposició a debatre. I a la Loli.

A la Pilar Teixidor dels Serveis Científicotècnics de la UB, perquè la seva predisposició a fer coses noves ha permès obtenir alguns dels resultats més interessants d'aquesta tesi.

Al Xavi Huete (i a la seva família) per haver-me ajudat amb la microscòpia òptica.

A la Universitat de Barcelona per concedir-me durant 4 anys una Beca de Recerca i Docència.

A tota la gent del Departament de Tecnologia Hortícola de l'IRTA, perquè a més d'ensenyar-me moltíssimes coses, sempre m'heu fet sentir com a casa, gràcies per la vostra amista! I específicament, a Pepe Montero per ser un manetes; a la Bea Cànovas per facilitar-me sempre la vida; a M<sup>a</sup> Carmen Bellido, Marc Pujol, Joana Zaragoza i Shirin Ahmed pel vostre ajut en la presa de dades; a la Feli de Herralde per ser una de les persones més operatives que conec; a Juan Ignacio Montero por su arte y salero, possiblement l'investigador amb més sentit de l'humor que conec; a Eulàlia Serra per les coques que ens *fas* cada any i pel teu somriure permanent; a l'Assumpció Antón per transmetre'm criteri; al Pere Muñoz, un tio fantàstic; a la Roser Cristòbal, per *aromatitzar* una etapa de la tesi; a la Mimar Alsina per la teva vàlua, ànims; a la Mireia Llobet per ser tan genuïna; i també a l'Oriol Marfà, la Rafi Cáceres, l'Anna Puerta i a la Nacima Meghelli.

A Carburos Metálicos S. A., que a través d'Agrigas ha finançat part dels experiments d'aquesta tesi. Al Xavier Sánchez-Molino i a l'Emili per ajudar-me fins i tot abans de la tesi.

A Lola López, Núria Carazo i Xavier Martínez per haver-me fet tan fàcil i agradable el curs que vaig estar a l'ESAB.

Als alumnes que m'han hagut de patir.

A Mário Ferreira do Reis por hacer más llevaderos algunos de los experimentos más duros que he realizado. Y a Susanna y Francisco por acogerme en su casa.

A Valentín Moya por ser mi amigo desde que tengo uso de razón.

A Miguel Ángel Mateo y a Gabriel Buendía por su amistad y sus ánimos constantes.

Je tiens à remercier Alicia Pérez et Arnaud Jeandin tout ce qu'ils ont fait pendant ces années pour moi et ma famille. À mon avis, nous avons eu de la chance d'avoir trouvé des amis comme vous.

Als companys de promoció amb els que hem compartit molt: Jon Permanyer, Sandra Pérez, Elvira Prat i Alfredo Alonso, Miquel Tuson, Jaume Puigagut, Nacho Pons i Dani Viadé.

Disculpes a tots aquells als que en aquest moment d'hipòxia cerebral transitòria m'hagi oblidat en aquests agraïments. Ho sento.

Un agraïment molt especial a algunes persones que han estat extraordinàriament generoses amb mi. Han fet molt més del que estaven obligats, i sense esperar res a canvi:

A Ricardo Simonneau por darme carta blanca y apoyarme en todo momento.

Al Xavier Aranda per invertir en mi el teu temps. Per atendre'm en tot moment i compartir inquietuds, de vegades imcompreses.

A la Dolors Sant per dipositar en mi tota la seva confiança i oferir-me tot el que estava a les seves mans.

Al Jaume Casadesús per la seva senzillesa, malgrat ser una de les persones amb més capacitat intel·lectual i criteri que he conegut. Aprendre de tu ha estat un plaer i tot un privilegi.

A Luis Tapia no sé si darle las gracias o recriminarle todo lo que ha hecho por mí. Lo que sí que está claro es que marcó un punto de inflexión en mi vida. Espero que algún día lo podamos discutir en persona.

Finalmente, a mi familia, que me lo ha dado todo en esta vida y no se merecía haber sufrido tanto las consecuencias de esta tesis. A mi madre, a mi padre y a mi hermana. Os quiero mucho.

A la que también es mi familia desde hace unos años: Tere (Puri), Marta, Juan y Carles.

Laura, no tinc paraules per expressar el que sento per tu. Sóc molt afortunat de tenir-te al meu costat, sempre i de manera incondicional. Ets la meva vida. Gràcies a tu i al Marc.





## ABREVIATURES

- A: Taxa neta d'assimilació de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
- A: Tractament de concentració de CO<sub>2</sub> ambiental
- A<sub>max</sub>: Taxa màxima de fotosíntesi neta amb llum i CO<sub>2</sub> saturants ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
- A<sub>sat</sub>: Capacitat fotosintètica o taxa màxima de fotosíntesi neta amb llum saturant a CO<sub>2</sub> ambiental ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
- BER: Proporció d'estimulació de la producció de biomassa pel CO<sub>2</sub> elevat (*Biomass Enhancement Ratio*)
- c<sub>a</sub>: Concentració atmosfèrica de CO<sub>2</sub> (ppm o  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol aire}^{-1}$ )
- CAM: Metabolisme àcid de les crassulàcies (*Crassulacean Acid Metabolism*)
- c<sub>i</sub>: Concentració intercel·lular de CO<sub>2</sub> (ppm o  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol aire}^{-1}$ )
- E: Taxa de transpiració ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
- E: Tractament de concentració de CO<sub>2</sub> elevada
- e<sub>dark</sub>: Discriminació isotòpica del carboni durant la respiració mitocondrial (%)
- FACE: *Free Air CO<sub>2</sub> Enrichment*
- F<sub>v</sub> / F<sub>m</sub>: Rendiment quàntic màxim del fotosistema II
- g<sub>s</sub>: Conductància estomàtica ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
- IAEA: *International Atomic Energy Agency*
- IPCC: *Intergovernmental Panel on Climate Change*
- IRGA: Analitzador de gasos per absorció a l'infraroig (*Infra Red Gas Analyser*)
- J<sub>max</sub>: Màxim transport electrònic potencial que contribueix a la regeneració de RuBP ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
- K<sub>m</sub>: Constant de Michaelis-Menten
- l: Limitació estomàtica (%)
- LAI: Índex d'àrea foliar (*Leaf Area Index*,  $\text{m}^2 \text{ m}^{-2}$ )
- LED: Díode emissor de llum (*Light Emitting Diode*)
- LWR: Relació de pes foliar (*Leaf Weight Ratio*,  $\text{g g}^{-1}$ )
- MES: Àcid 2-N-[Morfolino]etanolsulfònic
- MOT: Matèria orgànica total
- OTC: *Open Top Chambers*
- p: Proporció de carboni nou present a la respiració mitocondrial

PAR: Radiació fotosintèticament activa (*Photosynthetically Active Radiation*,  $\mu\text{mol Q m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )

PDB: *Pee Dee Belemnite*

PDH: Piruvat deshidrogenasa

PEP: Fosfoenol piruvat

PEPc: Fosfoenol piruvat carboxilasa

PPFD: Densitat de flux fotònic fotosintètic (*Photosynthetic Photon Flux Density*,  $\mu\text{mol Q m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )

PS: Pes sec

PSII: Fotosistema II

Q: Fotó o quantum

R<sub>D</sub>: Taxa de respiració mitocondrial a la foscor (*Dark Respiration*,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ kg}_{\text{PS}}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $\mu\text{mol O}_2 \text{ kg}_{\text{PS}}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )

RGR: Taxa de creixement relatiu (*Relative Growth Rate*,  $\text{g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ )

R<sub>L</sub>: Taxa de respiració mitocondrial a la llum (*Light Respiration*,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )

RQ: Quocient respiratori (*Respiratori Quocient*,  $\text{mol CO}_2 \text{ mol O}_2^{-1}$ )

Rubisco: Ribulosa 1,5-bisfosfat carboxilasa oxigenasa

RuBP: Ribulosa 1,5-bisfosfat

RWR: Relació de pes radicular (*Root Weight Ratio*,  $\text{g g}^{-1}$ )

SLW: Pes específic foliar (*Specific Leaf Weight*,  $\text{g m}^{-2}$ )

SWR: Relació de pes de la tija o el tronc (*Stem Weight Ratio*,  $\text{g g}^{-1}$ )

V<sub>c,max</sub>: Velocitat màxima de carboxilació o activitat *in vivo* de la Rubisco ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )

VPD: Dèficit de pressió parcial de vapor (*Vapor Pressure Deficit*, kPa)

VPD<sub>leaf</sub>: Gradient de pressió parcial de vapor d'aigua entre la fulla i l'aire (*Leaf Vapor Pressure Deficit*, kPa)

WUE: Eficiència en l'ús de l'aigua (*Water Use Efficiency*,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O}^{-1}$ )

Γ\*: Punt de fotocompensació de CO<sub>2</sub> (ppm o  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol aire}^{-1}$ )

Γ: Punt de compensació de CO<sub>2</sub> (ppm o  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol aire}^{-1}$ )

δ<sup>13</sup>C: Composició isotòpica del carboni (‰)

δ<sup>15</sup>N: Composició isotòpica del nitrogen (‰)

δ<sub>act</sub>: Composició isotòpica del CO<sub>2</sub> respirat després del marcatge (‰)

δ<sub>b</sub>: Composició isotòpica del CO<sub>2</sub> respirat abans del marcatge (‰)

$\delta_f$ :	Composició isotòpica del CO <sub>2</sub> respirat després del marcatge (‰)
$\delta_L$ :	Composició isotòpica del CO <sub>2</sub> de l'aire durant el marcatge (‰)
$\delta_{new}$ :	Composició isotòpica del CO <sub>2</sub> respirat resultant de l'oxidació del carboni nou (‰)
$\Delta_o$ :	Discriminació isotòpica del carboni de la fotosíntesi mesurada <i>on line</i> (‰)
$\delta_{old}$ :	Composició isotòpica del CO <sub>2</sub> respirat resultant de l'oxidació del carboni antic (‰)
$\delta_{MOT}$ :	Composició isotòpica del carboni de la MOT (‰)
$\delta_{MOT b}$ :	$\delta^{13}C_{MOT}$ de les fulles de les plantes A als 5 mesos de cultiu (‰)
$\delta_{MOT f}$ :	$\delta^{13}C_{MOT}$ de les fulles de plantes E als 5 mesos de marcatge (‰)
$\delta_r$ :	Composició isotòpica del CO <sub>2</sub> respirat (‰)
$\Phi_{PSII}$ :	Rendiment quàntic relatiu del fotosistema II



# ÍNDEX

<b>AGRAÏMENTS .....</b>	<b>5</b>
<b>ABREVIATURES .....</b>	<b>9</b>
<b>ÍNDEX .....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>19</b>
1. 1. L' AUGMENT DE CO <sub>2</sub> .....	19
1. 1. 1. <i>Efectes de l'augment de CO<sub>2</sub> sobre les plantes.....</i>	20
1. 1. 2. <i>Sistemes experimentals per a estudis amb CO<sub>2</sub> elevat.....</i>	23
1. 1. 3. <i>L'adobat carbònic .....</i>	25
1. 2. ESPÈCIES DE CREIXEMENT LENT.....	26
1. 2. 1. <i>Chamaerops humilis i Cycas revoluta .....</i>	26
1. 2. 2. <i>Les espècies de creixement lent i l'augment de CO<sub>2</sub>.....</i>	28
1. 3. ISÒTOPS ESTABLES DE CARBONI.....	29
1. 3. 1. <i>Discriminació isotòpica del carboni durant la fotosíntesi i la respiració.....</i>	30
1. 3. 2. <i>El marcatge isotòpic: una eina per estudiar el metabolisme del carboni .....</i>	33
<b>2. OBJECTIUS .....</b>	<b>37</b>
<b>3. MATERIAL I MÈTODES .....</b>	<b>41</b>
3. 1. MATERIAL VEGETAL .....	41
3. 2. DISSENY EXPERIMENTAL I CONDICIONS DE CULTIU.....	41
3. 3. MESURA DEL CREIXEMENT .....	43
3. 3. 1. <i>Mesures destructives .....</i>	43
3. 3. 2. <i>Mesures no destructives .....</i>	46
3. 3. 3. <i>Estudi de la cinètica de creixement.....</i>	46
3. 4. BESCANVI DE GASOS FOLIAR .....	47
3. 5. FLUORESCÈNCIA MODULADA DE LES CLOROFIL·LES .....	49
3. 6. BESCANVI DE GASOS DE LA CAPÇADA .....	51
3. 6. 1. <i>Descripció del sistema .....</i>	51
3. 6. 2. <i>Anàlisi dels cicles diaris.....</i>	55
3. 6. 3. <i>Corbes de resposta a la llum.....</i>	58

3. 6. 4. <i>Determinació dels punts de compensació</i> .....	59
3. 7. MÈTODES DE MARCATGE ISOTÒPIC DE CARBONI ( $^{12}\text{C} / ^{13}\text{C}$ ).....	672
3. 7. 1. <i>Marcatge isotòpic de carboni de llarga durada</i> .....	62
3. 7. 2. <i>Marcatge isotòpic de carboni de curta durada</i> .....	63
3. 8. MESURES ISOTÒPIQUES I ANÀLISI ELEMENTAL.....	68
3. 8. 1. <i>Determinació de la composició isotòpica del carboni (<math>\delta^{13}\text{C}</math>) del <math>\text{CO}_2</math></i> .....	68
3. 8. 2. <i>Composició isotòpica i anàlisi elemental de la matèria orgànica dels teixits vegetals</i> .....	71
3. 9. DETERMINACIÓ DE LA TAXA DE RESPIRACIÓ FOLIAR .....	72
3. 9. 1. <i>Determinació de la taxa de respiració per consum d'<math>\text{O}_2</math></i> .....	72
3. 9. 2. <i>Determinació de la taxa de respiració per emissió de <math>\text{CO}_2</math></i> .....	73
3. 9. 3. <i>Determinació del substrat respiratori per anàlisi de RQ</i> .....	74
3. 10. DETERMINACIÓ DE LA DENSITAT ESTOMÀTICA.....	74
3. 11. MICROSCÒPIA .....	75
3. 12. DISSENY I TRACTAMENT ESTADÍSTIC DE LES DADES .....	75
<b>4. RESULTATS</b> .....	<b>79</b>
4. 1. EFECTES DEL $\text{CO}_2$ ELEVAT SOBRE LA PRODUCCIÓ DE BIOMASSA.....	79
4. 1. 1. <i>Mesures destructives</i> .....	79
4. 1. 2. <i>Relació entre mesures destructives i no destructives</i> .....	85
4. 1. 3. <i>Anàlisi de la cinètica de creixement</i> .....	87
4. 2. RESPOSTA FISIOLÒGICA AL $\text{CO}_2$ ELEVAT .....	91
4. 2. 1. <i>Bescanvi de gasos de la capçada</i> .....	91
4. 2. 2. <i>Assimilació de <math>\text{CO}_2</math> i fluorescència de les clorofil·les foliar</i> .....	119
4. 2. 3. <i>Determinació de la taxa de respiració mitocondrial</i> .....	123
4. 2. 4. <i>Contingut de carboni i nitrogen</i> .....	126
4. 2. 5. <i>Densitat estomàtica</i> .....	128
4. 2. 6. <i>Talls histològics de fulles</i> .....	130
4. 3. GESTIÓ DEL CARBONI ASSIMILAT EN PLANTES DE CREIXEMENT LENT	132
4. 3. 1. <i>Distribució del carboni assimilat entre els diferents òrgans de la planta</i> .....	132
4. 3. 2. <i>Acumulació a les fulles del carboni recentment assimilat</i> .....	137
4. 3. 3. <i>Participació del carboni recentment assimilat en la respiració</i> .....	139

---

<b>5. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>145</b>
5. 1. DETERMINACIÓ DEL METABOLISME FOTOSINTÈTIC DE <i>Cycas revoluta</i> Thunb. i <i>Chamaerops humilis</i> L.....	145
5. 2. FISIOLOGIA DE LA RESPOSTA AL CO <sub>2</sub> ELEVAT.....	147
5. 2. 1. Resposta estomàtica .....	147
5. 2. 2. Resposta de la fotosíntesi .....	148
5. 2. 3. Resposta de la respiració .....	155
5. 2. 4. Implicacions sobre els punts de compensació.....	159
5. 3. RESPOSTA DE LA PRODUCCIÓ DE BIOMASSA AL CO <sub>2</sub> ELEVAT .....	162
5. 4. GESTIÓ DEL CARBONI ASSIMILAT EN PLANTES DE CREIXEMENT LENT	167
<b>6. CONCLUSIONS.....</b>	<b>176</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>181</b>





# 1. INTRODUCCIÓ

---



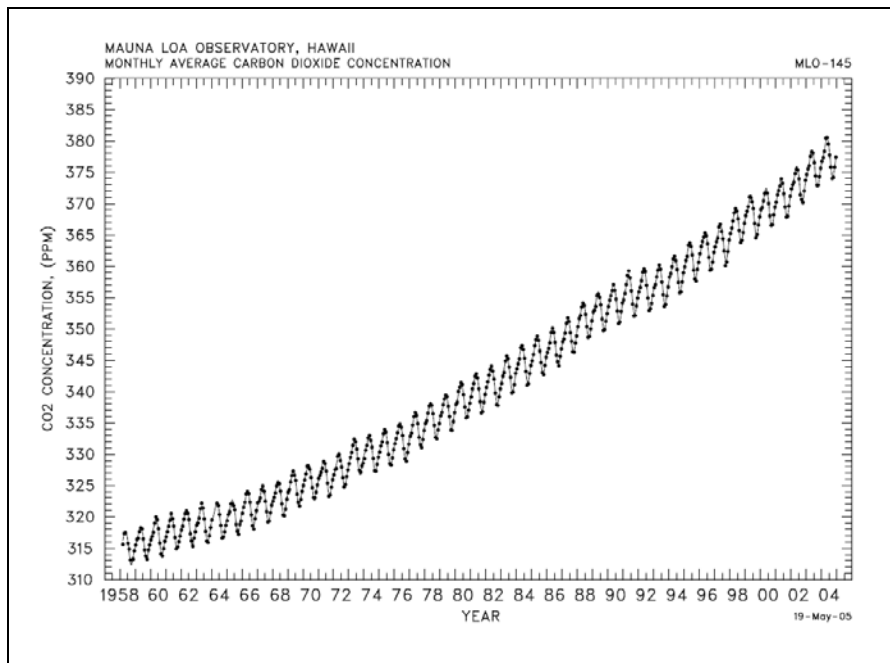
# 1. INTRODUCCIÓ

## 1. 1. L'AUGMENT DE CO<sub>2</sub>

L'augment de la concentració atmosfèrica de CO<sub>2</sub> que s'està produint des de la revolució industrial és un fenomen indiscutible. Durant diversos milers d'anys, la concentració de CO<sub>2</sub> s'havia mantingut estable al voltant de 280 ppm, però a partir de 1800 va començar a incrementar, principalment a causa de les emissions antropogèniques (Prentice *et al.* 2001). Des de 1959, l'equip de Keeling realitza mesures directes de la concentració de CO<sub>2</sub> a Mauna Loa (Hawaii, USA). Així, les seves dades mostren que l'any 2004 la concentració havia pujat fins a 377 ppm (Fig. 1.1.1, Keeling i Worf 2002, 2005), valor que representa quasi un 35% d'augment en els darrers 200 anys. Aquests resultats també permeten observar com aquest increment s'està accelerant, ja que el 63% de l'augment de CO<sub>2</sub> s'ha produït durant els darrers 45 anys. Les estimacions basades en l'anàlisi del gel dels glacials indiquen que actualment la concentració de CO<sub>2</sub> presenta el nivell més elevat dels últims 420.000 anys i, probablement de fa 20 milions d'anys (Prentice *et al.* 2001). Realitzar prediccions de la futura concentració de CO<sub>2</sub> resulta complex, ja que requereix diverses assumpcions sobre creixement econòmic, avenços tecnològics, així com segrest de carboni pels processos biològics i geològics. Malgrat aquestes dificultats, les estimacions prediuen un clar augment del CO<sub>2</sub> atmosfèric. D'aquesta manera, els models desenvolupats més conservadors pronostiquen que la concentració de CO<sub>2</sub> de l'any 2100 pujarà fins a 540 ppm, mentre que les projeccions realitzades assumint escenaris més pessimistes arriben a les 970 ppm (Nowak *et al.* 2004).

Les activitats humanes com el transport, la indústria, la desforestació o l'agricultura no només estan provocant un augment en la concentració atmosfèrica de CO<sub>2</sub> (entre 2 i 4 ppm anuals), també estan incrementant altres gasos d'efecte hivernacle (Prentice *et al.* 2001). El CO<sub>2</sub> i la resta d'aquests gasos absorbeixen la radiació infraroja, per això la seva acumulació a l'atmosfera és la causa de l'escalfament global (Watson *et al.* 1998). Previsions del *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC) basades en complexos models climàtics indiquen que la temperatura mitjana de la superfície del planeta i el nivell del mar augmentaran de 1.4 a 5.8°C i de 10 a 90 cm, respectivament, abans de l'any 2100 (IPCC 2001, Sánchez-Díaz *et al.* 2004). Altres conseqüències podrien ser alteracions al patró de

pluges, produint-se intenses tempestes a les zones costaneres i seques a l'interior dels continents, que provocarien un increment de les zones desertitzades (Melillo *et al.* 2001).



**Figura 1.1.1.** Increment de la concentració atmosfèrica de CO<sub>2</sub> durant els últims 45 anys, obtinguda a partir de mesures directes a Mauna Loa, Hawaii, USA (Keeling i Whorf 2005).

Per tant, en el context actual resulta lògic que l'estudi dels efectes de l'increment atmosfèric de CO<sub>2</sub> sigui una línia de recerca essencial en l'àmbit de l'ecologia i la fisiologia vegetal. En aquest sentit, per tal d'estimar la resposta dels vegetals als canvis que estan esdevenint, són molt valuosos els treballs que consideren la interacció amb altres factors, com la temperatura o la disponibilitat hídrica, especialment en condicions naturals. Però donades les prediccions existents, prenen especial rellevància els estudis que avaluin l'impacte del CO<sub>2</sub> elevat a llarg termini sobre els vegetals.

### *1. 1. 1. EFECTES DE L'AUGMENT DE CO<sub>2</sub> SOBRE LES PLANTES*

A les plantes C<sub>3</sub>, el CO<sub>2</sub> atmosfèric entra per difusió fins als cloroplasts, lloc on es produeix l'assimilació de CO<sub>2</sub> per acció de l'enzim Ribulosa-1,5-bisfosfat carboxilasa/oxigenasa

(Rubisco). Així, un increment de la concentració atmosfèrica de CO<sub>2</sub> comporta un augment de la fotosíntesi, ja que eleva la disponibilitat del principal substrat de la Rubisco, el qual es troba a concentracions subòptimes (Long *et al.* 2004). Però a més, disminueix la fotorespiració a través d'una inhibició competitiva de l'oxigenació catalitzada per la Rubisco (Azcón-Bieto *et al.* 2004). L'increment de la taxa fotosintètica per efecte del CO<sub>2</sub> s'ha vist traduït en un major creixement de les plantes a múltiples estudis (Bowes 1993, Drake *et al.* 1997, Long *et al.* 2004). A curt termini també s'ha observat una reducció de la conductància estomàtica a elevades concentracions de CO<sub>2</sub> (Mott 1988, Ceulemans i Mousseau 1994). Per això, l'eficiència en l'ús de l'aigua (WUE) augmenta significativament per efecte directe del CO<sub>2</sub> elevat (Drake *et al.* 1997).

No obstant, quan les plantes creixen contínuament a CO<sub>2</sub> elevat es produeixen amb freqüència canvis bioquímics, morfològics i fisiològics que disminueixen la capacitat fotosintètica de la fulla. D'aquesta manera, a moltes espècies els grans increments inicials observats a la taxa de fotosíntesi neta sota CO<sub>2</sub> elevat no es mantenen a llarg termini. Aquest fenomen es coneix com aclimatació a la baixa o *down-regulation* de la fotosíntesi (Drake *et al.* 1997, Long *et al.* 2004). Aquesta disminució ve associada a un increment en la concentració de carbohidrats a les fulles i una reducció en la quantitat i en l'activitat de la Rubisco (Bowes 1993, Drake *et al.* 1997, Long *et al.* 2004). Així, l'increment inicial de fotosíntesi a CO<sub>2</sub> elevat comporta un augment de carbohidrats a les fulles (Azcón-Bieto 1983, Nie *et al.* 1995, Drake *et al.* 1997, Moore *et al.* 1999, Long *et al.* 2004), que en molts casos la planta no és capaç de processar. Es va proposar que l'acumul de carbohidrats a la fulla és el desencadenant de l'aclimatació fotosintètica, que provocaria una disminució de l'activitat enzimàtica a la font a conseqüència d'un fenomen de *feedback* negatiu (Drake *et al.* 1997). Actualment està més acceptat que el senyal es donaria a través del *pool* de sacarosa a la cèl·lula. Un augment de sacarosa a la cèl·lula, sembla induir una disminució de l'expressió gènica de la subunitat petita de la Rubisco (Moore *et al.* 1999, Smeekens 2000, Rolland *et al.* 2002). La síntesi de Rubisco suposa una gran inversió en nitrogen, per això el fet que les plantes crescudes a CO<sub>2</sub> elevat produeixin menys enzim indicaria una tendència a economitjar el nitrogen (Stitt i Krapp 1999), mantenint normalment taxes de fotosíntesi superiors a les que es donen a CO<sub>2</sub> ambiental.

En canvi, l'efecte a llarg termini del CO<sub>2</sub> elevat sobre els estomes no és antagònic amb l'efecte a curt termini. Així, en plantes crescudes a CO<sub>2</sub> elevat s'ha descrit una reducció de la

densitat estomàtica (Gunderson i Wullschleger 1994, Drake *et al.* 1997), confirmada per la disminució observada al material d'herbari a partir de la revolució industrial (Woodward 1987, Peñuelas i Matamala 1990, Serna i Fenoll 2000). Malgrat que el mecanisme és desconegut, sembla que el gen *HIC* (*High Carbon Dioxide*) hi podria estar implicat. Aquest gen codifica per un enzim implicat a la biosíntesi d'àcids grassos de cadena llarga, que actuaria com un regulador negatiu del desenvolupament estomàtic en condicions de CO<sub>2</sub> elevat (Gray *et al.* 2000, Beerling 2005).

A diferència de la fotosíntesi o la conductància estomàtica, l'efecte directe del CO<sub>2</sub> sobre la respiració és més variable. Així, s'han descrit manteniments, disminucions o fins i tot augments de respiració. Avui en dia, la hipòtesi més acceptada és que el CO<sub>2</sub> pràcticament no modifica per efecte directe la taxa de respiració de les plantes (González-Meler *et al.* 2004), ja que, malgrat que es dona una reducció de l'activitat enzimàtica per efecte directe del CO<sub>2</sub> elevat (González-Meler *et al.* 1996), no és important a escala de teixit o de planta (González-Meler i Siedow 1999, Atkin i Tjoelker 2003, Davey *et al.* 2004, Gonzalez-Meler *et al.* 2004).

La majoria d'estudis mostren una reducció de la respiració per efecte indirecte o a llarg termini del CO<sub>2</sub> elevat (Isdo i Kimball 1992, Azcón-Bieto *et al.* 1994, Amthor 1997, Drake *et al.* 1997, Curtis i Wang 1998; Norby *et al.* 1999). A moltes espècies, la disminució de la respiració en plantes crescudes a CO<sub>2</sub> elevat està molt relacionada amb un descens del contingut en nitrogen (Tjoelker *et al.* 1999). Però, en alguns casos s'ha demostrat que artefactes amb la [CO<sub>2</sub>] de mesura haurien provocat una subestima de la respiració a elevat CO<sub>2</sub> (Jahnke i Krewitt 2002, Pons i Welschen 2002, Davey *et al.* 2004). Per això, avui en dia s'ha observat una resposta a llarg termini de la respiració al CO<sub>2</sub> elevat variable en funció de l'espècie estudiada. Així, en alguns casos s'han donat reduccions o increments de respiració, però també absència d'efecte en resposta al CO<sub>2</sub> (Amthor 2000, Davey *et al.* 2004, González-Meler i Taneva 2005).

Evidentment, la resposta més habitual al CO<sub>2</sub> elevat és una estimulació general del creixement (Long 1991, Nowak *et al.* 2004). Però estudis a mig o llarg termini posen de manifest canvis en l'al·lometria (Bazzaz *et al.* 1993, Callaway 1994) o a la quantitat i proporció de biomassa radicular (BassiriRad *et al.* 1997, Will i Teskey 1997), que podrien suposar alteracions importants.

Encara es desconeix com els canvis de CO<sub>2</sub> afectaran a llarg termini als ecosistemes terrestres, i a les plantes en particular. És una qüestió crucial, ja que la vegetació i els boscos poden tenir un paper fonamental en la mitigació dels efectes del canvi climàtic, atesa la seva capacitat d'absorbir el CO<sub>2</sub>. És a dir, podrien actuar com a segrestadors de carboni potencials. Per això, és molt important saber quin serà l'impacte sobre la vegetació, i com la fotosíntesi i la respiració respondran en una atmosfera amb CO<sub>2</sub> elevat (Drake *et al.* 1997; Long *et al.* 2004, Nowak *et al.* 2004). S'espera que l'augment de la concentració atmosfèrica de CO<sub>2</sub> causi importants respostes sobre la fotosíntesi, la fotorespiració, la respiració i la conductància estomàtica dels vegetals (Ceulemans i Mousseau 1994, Drake *et al.* 1997). Aquests canvis fisiològics poden donar lloc a un increment del creixement i de l'eficiència en l'ús de l'aigua (WUE), així com variacions en l'al·lometria (Callaway *et al.* 1994). Per tot això, aquests processos han estat i són objecte d'estudis ecològics, fisiològics, bioquímics i agronòmics (González-Meler *et al.* 1997).

### 1. 1. 2. SISTEMES EXPERIMENTALS PER A ESTUDIS AMB CO<sub>2</sub> ELEVAT

L'augment de la concentració atmosfèrica de CO<sub>2</sub> ha generat un gran interès per aprofundir en el coneixement de les respostes de les plantes al CO<sub>2</sub> elevat, tant dels cultius, de les espècies salvatges o dels ecosistemes naturals (Sánchez-Díaz *et al.* 2004). Per això, s'han desenvolupat diversos sistemes experimentals amb l'objectiu d'intentar predir els futurs efectes del CO<sub>2</sub>. En general es tracta d'instal·lacions que permeten incrementar la concentració de CO<sub>2</sub> de l'ambient de creixement de les plantes. Els diferents dissenys permeten l'estudi de la resposta al CO<sub>2</sub> a llarg termini i a diferents escales de treball, des de la fulla a l'ecosistema.

Les cambres de creixement són sistemes on es pot controlar de manera precisa els principals paràmetres ambientals (CO<sub>2</sub>, llum, temperatura o HR). Per això, permeten generar artificialment la combinació de condicions ambientals desitjada. Proporcionen, per tant, un elevat grau de control ambiental als experiments, cosa que fa que els resultats obtinguts siguin fàcilment repetibles i comparables, encara que difícilment es poden extrapolar a condicions naturals. Altres inconvenients són la baixa intensitat lumínica que s'aconsegueix i la limitació d'espai, que condiciona la mida i el nombre d'individus que s'hi poden introduir (Drake *et al.* 1985, Körner 1995).

Els hivernacles són estructures tancades amb coberta transparent o translúcida d'elevada transmitància, típicament de vidre o plàstic, per això la radiació que arriba a l'interior no és massa inferior a la solar a l'exterior. La capacitat de control de l'ambient de l'hivernacle depèn de l'equipament instal·lat (Matallana i Motero 1995, Hanan 1998) encara que sempre és menor que la d'una cambra de creixement. D'altra banda, també resulta difícil extrapolar a camp els resultats obtinguts amb aquest tipus d'instal·lacions, tot i que en menor mesura que en el cas de les cambres de creixement (Drake *et al.* 1985, Schulze i Mooney 1993).

Un altre sistema són les denominades *Open Top Chambers* (OTC) o cambres a cel obert, la utilització de les quals es va estendre molt a principis dels 90, ja que permeten estudiar *in situ* i amb llum natural les respostes dels cultius i de la vegetació natural. Es tracta de cambres cilíndriques de plàstic desproveïdes de sostre, de dimensions variables (per exemple uns 3 m diàmetre i uns 2.5 m d'alçada). S'ha de tenir en compte les seves limitacions, atès que la presència de paret lateral provoca un flux d'aire i una turbulència anormal dins de la cambra, la qual cosa comporta gradients interns de temperatura i humitat. Aquestes alteracions i l'efecte hivernacle, generen diferències ambientals entre l'interior i l'exterior, que s'accentuen sota condicions d'elevada irradiància. Per això, el creixement vegetal dins i fora de la cambra acostuma a presentar diferències importants (Schulze i Mooney 1993, Terradas 2001, Gifford 2004).

Per a estudis ecològics d'enriquiment carbònic els sistemes més utilitzats són els *FACE* (*Free Air CO<sub>2</sub> Enrichment*), l'ús dels quals ha proliferat molt durant els últims anys. Els *FACE* són instal·lacions situades en espais oberts, com boscos o camps de cultiu, on es realitza un increment de la concentració atmosfèrica de CO<sub>2</sub>. Aquests sistemes eviten, per tant, les alteracions ambientals que es produeixen als experiments amb la resta d'equipaments. El principal inconvenient és l'elevat cost, ja que es treballa amb parcel·les circulars de gran superfície, el diàmetre de les quals pot superar els 30 m, sense oblidar que es formen gradients importants de CO<sub>2</sub> en condicions de fort vent (Gifford 2004). Una altra alternativa que presenta molta analogia amb els sistemes *FACE* és l'estudi de zones en què existeixen emissions naturals de CO<sub>2</sub>. Aquestes fonts naturals de CO<sub>2</sub> són bastant nombroses, encara que només unes poques són útils per a estudis d'enriquiment carbònic, ja que en la major part dels casos aporten baixes quantitats de CO<sub>2</sub> o bé presenten impureses tòxiques per a les plantes (Tognetti *et al.* 2000, Terradas 2001).



### 1. 1. 3. L'ADOBAT CARBÒNIC

L'adobat carbònic és una tècnica agronòmica que consisteix en l'enriquiment dels nivells atmosfèrics de CO<sub>2</sub> en hivernacles amb l'objectiu d'incrementar i/o millorar la productivitat dels cultius. A les regions fredes, les finestres dels hivernacles acostumen a estar tancades per retenir la calor a l'interior. En aquestes condicions, la fotosíntesi provoca una disminució de la concentració de CO<sub>2</sub>. Per això, en aquestes zones l'adobat carbònic és una tècnica molt habitual, ja que evita uns nivells de CO<sub>2</sub> excessivament subòptims (Hanan 1998). En canvi, a climes càlids, l'aplicació de CO<sub>2</sub> està poc estesa i presenta dificultats a causa de la necessitat de ventilar els hivernacles per tal d'evitar un excés de temperatura. Aquesta renovació de l'aire evita que la concentració de CO<sub>2</sub> dins l'hivernacle sigui molt inferior a l'atmosfèrica, però a més, provoca la fuga de part del CO<sub>2</sub> injectat. No obstant, la sinèrgia entre nivells elevats de radiació i CO<sub>2</sub> és un factor aprofitable en clima mediterrani. Així, està demostrat que una injecció intermitent entre períodes de ventilació en un dia assolellat dona més rendiment que una aplicació contínua en un dia núvol (Martin 1984, Tremblay i Gosselin 1998). Per tant, és necessari estudiar les interaccions del CO<sub>2</sub> amb altres paràmetres climàtics que afecten la fisiologia i la productivitat en l'àmbit mediterrani, com la llum, la temperatura o l'aigua (Sánchez-Guerrero 1999). També cal tenir en compte que l'adobat carbònic no afecta quantitativament igual totes les plantes. En aquesta línia, un altre factor variable és la [CO<sub>2</sub>] idònia, que depèn de l'espècie, l'edat o les instal·lacions (Savé *et al.* 1998). Integrant aquests paràmetres es pot estimar la relació cost/benefici de l'aplicació en cada cas. Per tant, per garantir la viabilitat, l'estratègia d'aplicació s'haurà d'adequar al conjunt de condicions específiques donades en cada situació.

A l'àrea mediterrània, com s'ha comentat, la principal dificultat d'aquest sistema experimental és el manteniment de nivells elevats de CO<sub>2</sub> durant el dia en èpoques càlides (Savé *et al.* 1998). Per això, cal tenir present les limitacions que presenta un experiment d'adobat carbònic, ja que normalment no es pot mantenir la concentració de CO<sub>2</sub> totalment constant al llarg de l'assaig. D'altra banda, atès que els hivernacles són instal·lacions comercials de cultiu, permeten avaluar l'efecte del CO<sub>2</sub> sobre moltes espècies vegetals en condicions realistes. Aquest fet unit a què es pugui regular l'ambient i treballar en condicions ambientals semicontrolades fan que els experiments d'adobat carbònic siguin una molt bona solució experimental per estudiar l'impacte del CO<sub>2</sub> elevat sobre els cultius.

## 1. 2. ESPÈCIES DE CREIXEMENT LENT

### 1. 2. 1. *Chamaerops humilis* i *Cycas revoluta*

El margalló (*Chamaerops humilis* L., *Arecaceae*) és l'única palmera autòctona d'Europa, que en castellà rep el nom de *palmito* o *palmera enana*. S'estén per tot el litoral mediterrani occidental, des del sud de Portugal fins a Líbia. A la península ibèrica, el límit nord de la seva àrea de distribució es troba a Girona. Creix espontàniament en tot tipus de sòls i preferentment a altituds inferiors a 1000 m de la franja costanera (Folch 1981). Pot créixer en zones de baixa pluviometria i altes temperatures. També sobreviu a altres condicions desfavorables com ara la salinitat. Aquesta gran capacitat fa que en moltes ocasions creixi en solitari a zones molt degradades. Per això el margalló es pot considerar un dels elements més representatius de la vegetació del sud-oest d'Europa, junt amb altres espècies com l'olivera (*Olea europaea*), el garrofer (*Ceratonia siliqua*), l'alzina (*Quercus ilex*) o el garric (*Quercus coccifera*). La majoria de peus no superen els 3 m d'alçada, però poden assolir el 9 m si es desenvolupen en condicions favorables. Les fulles són palmatisectes amb folíols punxeguts disposats radialment (de 12 a 20) que de vegades són bífids (Fig. 1.2.1). La forma general de les fulles és circular i poden arribar als 80 cm de diàmetre en individus adults. El pecíol és llarg, robust i presenta espines.

*Chamaerops humilis* és una planta de creixement molt lent, fins al punt que aquesta qualitat defineix etimològicament l'espècie: petit (del grec *chamai*), arbust (del grec *rhops*) de baix creixement (del llatí *humilis*). Segurament aquest fet deu estar relacionat amb la seva gran longevitat. De fet, a Pàdua (Itàlia) es coneix un exemplar viu que data de l'any 1585.

El margalló té diverses aplicacions. Com a espècie autòctona, al sud d'Europa cada vegada es fa servir més amb finalitats ornamentals, ja que a més d'una gran supervivència, té pocs requeriments i necessita molt poc manteniment. Pels mateixos motius, també s'utilitza per revegetar zones degradades. Una altra aplicació es troba en l'alimentació, ja que la gemma apical, que s'anomena el cor o cabdell, és comestible. Tradicionalment, les fulles seques s'utilitzaven per fabricar cistells o escobres, mentre que també se n'extreien les fibres per a la indústria paperera i tèxtil.



**Figura 1.2.1.** Imatges de *Chamaerops humilis* en condicions naturals.



**Figura 1.2.2.** Imatge d'una planta de *Cycas revoluta* en un contenidor.

Malgrat el seu aspecte, *Cycas revoluta* Thunb. (*Cycadaceae*) no és una palmera. De fet està molt allunyada filogenèticament de les Arecàcies, ja que es tracta d'una gimnosperma. Pertany al grup de les cícades (divisió *Cycadophyta*), l'origen del qual se situa al Paleozoic, fa més de 230 milions d'anys, encara que el màxim desenvolupament el van tenir durant el Mesozoic (Norstog i Nicholls 1997). Per això, *Cycas revoluta*, l'espècie més representativa i

abundant, es considera un fòssil vivent. És originària del Japó, però actualment la seva distribució natural s'estén al llarg de les regions tropicals i subtropicals del pacífic, sobretot el sud del Japó i la Xina. Les fulles són pinnades, coriàcies, de color verd intens i es disposen radialment a la part superior del tronc, on s'insereixen a través d'un pecíol amb espines. Cada fulla està formada per 30-100 pinnes unides per un raquis (Fig. 1.2.2). Les fulles noves emergeixen simultàniament i amb un patró circular. Malgrat això, es tracta de plantes de creixement molt lent. Habitualment, aquesta brotada es produeix anualment, però sota condicions ambientals molt favorables s'ha arribat a obtenir-ne tres per any. *Cycas revoluta*, a més d'una gran perdurabilitat com espècie, també presenta una elevadíssima longevitat, pel que alguns exemplars poden sobrepassar els 1000 anys.

Actualment *Cycas revoluta* està àmpliament distribuïda al llarg de totes les zones temperades, inclosa l'àrea mediterrània, ja que es cultiva a molts països amb finalitats ornamentals. És una espècie estèticament molt apreciada, tant a nivell particular com per enjardinaments públics.

### 1. 2. 2. LES ESPÈCIES DE CREIXEMENT LENT I L'AUGMENT DE CO<sub>2</sub>

La resposta a llarg termini de les plantes al CO<sub>2</sub> elevat és poc coneguda i controvertida. Així, tot i la gran quantitat d'estudis existents, a causa de la complexitat del tema, continua havent aspectes poc clars (Long *et al.* 2004). En el cas de les espècies de creixement lent, el comportament enfront l'increment de CO<sub>2</sub> és pràcticament desconegut, ja que es tracta de plantes amb una fisiologia peculiar i no massa estudiada. Moltes d'aquestes espècies colonitzen hàbitats de condicions adverses, on sobreviuen gràcies a adaptacions. Per això, no està totalment clar si les causes del creixement lent d'aquestes espècies es deu principalment a les condicions ambientals desfavorables del lloc on viuen, o bé la limitació és pròpia de l'espècie. Sembla que ambdós components són importants. D'aquesta manera, un dels dubtes que existeix al voltant de l'efecte del CO<sub>2</sub> sobre aquestes plantes és si l'augment de CO<sub>2</sub> serà un estímul pel creixement o per contra aquestes espècies no seran capaces d'aprofitar-lo tant com una espècie de creixement ràpid. En aquest sentit, hi ha estudis totalment contraposats. D'una banda, Lloyd i Farquhar (1996, 2000) indiquen, basant-se en models de fotosíntesi, que les espècies de creixement lent tenen una potencial resposta al CO<sub>2</sub> elevat superior a la que tenen les espècies de creixement ràpid. En canvi, Poorter (1998) i Poorter i Pérez-Soba (2001) exposen que aquesta hipòtesi no s'ajusta a les dades existents a la literatura, i que les plantes

de creixement lent tenen una menor resposta al CO<sub>2</sub> a causa de la seva pròpia naturalesa i també a conseqüència d'uns elevats costos de construcció. Per tant, sembla clar que són necessaris estudis per intentar aclarir com respondran les plantes de creixement lent a l'increment de CO<sub>2</sub> atmosfèric.

D'altra banda, cada vegada és més important la producció d'espècies mediterrànies autòctones destinades a la creació de nous espais verds o a la revegetació de zones degradades (Mitrakos 1980, Savé *et al.* 1996). En aquest context d'una creixent demanda de plançons, la producció viverística d'espècies autòctones i llenyoses, s'està incrementant i desenvolupant. Per tant, són necessaris canvis en la producció, que s'han de traduir en una diversificació de les espècies produïdes, una intensificació dels cultius i una millora del producte final (Masvidal 1993). En aquest sentit, resulta interessant comprovar si l'adobat carbònic és una tècnica que pot contribuir positivament a donar resposta a aquestes necessitats.

### 1. 3. ISÒTOPS ESTABLES DE CARBONI

Els isòtops són àtoms d'un mateix element que difereixen únicament a la seva massa atòmica. És a dir, són àtoms que presenten al nucli el mateix nombre de protons (mateix número atòmic) però un nombre diferent de neutrons (diferent número màssic). Els diferents isòtops d'un àtom poden ser estables o radioactius. Els núclids<sup>1</sup> dels isòtops estables, com el seu nom indica, es mantenen una vegada formats. En canvi, els radioactius es desintegren espontàniament, emetent partícules  $\alpha$  i  $\beta$ , fins esdevenir isòtops estables (Dawson i Brooks 2001).

Els isòtops estables de pràcticament tots els elements estan formats per un isòtop molt abundant i un o dos isòtops amb una molt baixa abundància. L'abundància relativa és el percentatge de cada isòtop en relació al total d'àtoms de l'element. En el cas concret del carboni, el CO<sub>2</sub> atmosfèric conté tres isòtops: <sup>12</sup>C, <sup>13</sup>C i <sup>14</sup>C, dels quals només el <sup>12</sup>C i el <sup>13</sup>C són estables. Dintre dels isòtops estables de carboni, el més abundant és el més lleuger, és a dir, el <sup>12</sup>C (98.89%), mentre que el més pesat, el <sup>13</sup>C, només suposa un 1.1%. La composició isotòpica ( $\delta$ ) és una altra manera d'expressar l'abundància relativa dels isòtops. Per conveni, les abundàncies o les seves variacions s'expressen en relació a l'isòtop minoritari. Per això,

---

<sup>1</sup> El terme núclid fa referència al nucli d'un àtom o isòtop específic, caracteritzat per un número atòmic (Z) i un número màssic (A), sense englobar els electrons de l'àtom.

qualsevol esdeveniment que augmenti la proporció de  $^{13}\text{C}$  respecte a  $^{12}\text{C}$  es defineix com enriquiment. En canvi, si l'alteració disminueix la proporció de  $^{13}\text{C}$  s'anomena empobriment. Així, la composició isotòpica del carboni ( $\delta^{13}\text{C}$ ) d'una mostra es defineix com la proporció relativa de  $^{13}\text{C}$  i  $^{12}\text{C}$  en relació a un estàndard<sup>2</sup> i expressat en tant per mil (‰):

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left( \frac{R_{\text{mostra}}}{R_{\text{estàndard}}} - 1 \right) \cdot 1000 \quad \text{on} \quad R = \frac{^{13}\text{CO}_2}{^{12}\text{CO}_2}$$

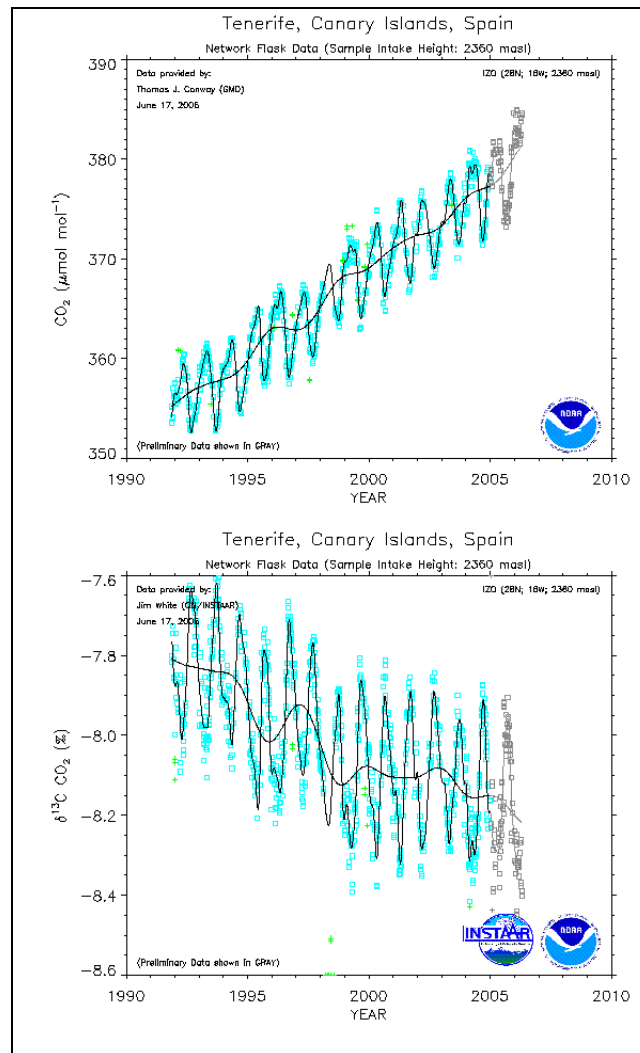
Per tant, valors positius de  $\delta^{13}\text{C}$  signifiquen que la mostra està enriquida en  $^{13}\text{C}$  en relació a l'estàndard, és a dir, conté més  $^{13}\text{C}$  que l'estàndard. Per contra, valors negatius de  $\delta^{13}\text{C}$  indiquen un empobriment de la mostra en  $^{13}\text{C}$ . Aquest és el cas del  $\text{CO}_2$  de l'aire, per exemple, que presenta uns valors de  $\delta^{13}\text{C}$  d'aproximadament -8‰. En aquest sentit, s'ha observat que a conseqüència de les emissions antropogèniques s'està donant una alteració de la  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  de l'aire paral·lela a l'increment de  $\text{CO}_2$  atmosfèric (Fig. 1.3.1, <http://www.cmdl.noaa.gov/ccgg/iadv/index.php>). Així, la crema de combustibles fòssils, empobrits en  $^{13}\text{C}$  (veure apartat 1.3.1), estaria fent disminuir de manera generalitzada la composició isotòpica del carboni del  $\text{CO}_2$  de l'aire.

### 1. 3. 1. DISCRIMINACIÓ ISOTÒPICA DEL CARBONI DURANT LA FOTOSÍNTESI I LA RESPIRACIÓ

Les propietats químiques d'un element estan determinades principalment pel nombre d'electrons. Per això, tenint en compte que dos isòtops d'un mateix element presenten el mateix nombre d'electrons, també tenen les mateixes propietats químiques. En canvi, les propietats físiques són diferents entre isòtops, ja que presenten diferent nombre de neutrons i, per tant, diferent massa atòmica. Aquesta alteració de les propietats físiques provoca que els diferents isòtops tinguin un comportament químic i físic desigual. Així, normalment un dels isòtops es veu implicat preferentment a cadascuna de les reaccions físiques o químiques. Per tant, la composició isotòpica del producte de la reacció variarà respecte al reactiu. Aquest fenomen s'anomena fraccionament isotòpic (Dawson i Brooks 2001).

---

<sup>2</sup> L'estàndard original que es va utilitzar era el PDB (*Pee Dee Belemnite*), mineral d'una roca que es va esgotar. Per això, actualment s'utilitzen uns patrons secundaris que la *International Atomic Energy Agency* (IAEA, Viena) va generar en relació a l'estàndard original.



**Figura 1.3.1.** Evolució de la concentració i la composició isotòpica del carboni ( $\delta^{13}\text{C}$ ) del  $\text{CO}_2$  de l'aire dels darrers 15 anys a l'observatori d'Izaña (Tenerife) de l'Institut Nacional de Meteorologia, que col·labora amb la xarxa del GMD (*Global Monitoring Division*) que pertany a la NOAA (*National Oceanic & Atmospheric Administration, USA*).

Bàsicament existeixen dos tipus de fenòmens que originen un fraccionament isotòpic: termodinàmics i cinètics. Els fenòmens termodinàmics expliquen el fraccionament isotòpic que es dona a les reaccions d'equilibri, mentre que els cinètics bàsicament a les reaccions enzimàtiques. Normalment, el fraccionament isotòpic acostuma a actuar en contra de l'isòtop més pesat.

La discriminació isotòpica del carboni durant la fotosíntesi ( $\Delta$ ) és coneguda des de fa molt de temps (Farquhar *et al.* 1989). El procés presenta diversos punts de fraccionament, dels quals

els models desenvolupats tenen en compte bàsicament dos components: la difusió i la carboxilació (Farquhar *et al.* 1982). En plantes C<sub>3</sub>, durant l'assimilació de CO<sub>2</sub> es produeix una discriminació en contra de l'isòtop més pesat (<sup>13</sup>C, Fig. 1.3.1), tant a nivell de la difusió del CO<sub>2</sub> a través dels estomes (4.4‰, Craig 1954) com a nivell de la carboxilació per part de la Rubisco (29‰ *in vitro*, Farquhar *et al.* 1989). Per això, la matèria orgànica de les plantes C<sub>3</sub> es troba empobrida en <sup>13</sup>C, és a dir, tenen més abundància de <sup>12</sup>C que l'aire. Així, la composició isotòpica del carboni de la matèria orgànica ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$ ) en aquestes plantes se situa entre -20 i -35‰, valor molt més negatiu que el de l'aire ( $\approx -8\text{‰}$ ). Com s'ha comentat, el principal punt de discriminació es troba a nivell de la carboxilació. Això fa que les plantes amb un metabolisme fotosintètic diferent presentin valors de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  molt diferents. En el cas de les plantes C<sub>4</sub>, la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  no és tan negativa (entre -7 i -17‰), ja que la PEP carboxilasa, enzim responsable de la primera carboxilació del CO<sub>2</sub>, presenta una discriminació molt baixa (0 - 5‰). La  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  de les plantes CAM és intermèdia entre la d'una planta C<sub>3</sub> i una C<sub>4</sub>.

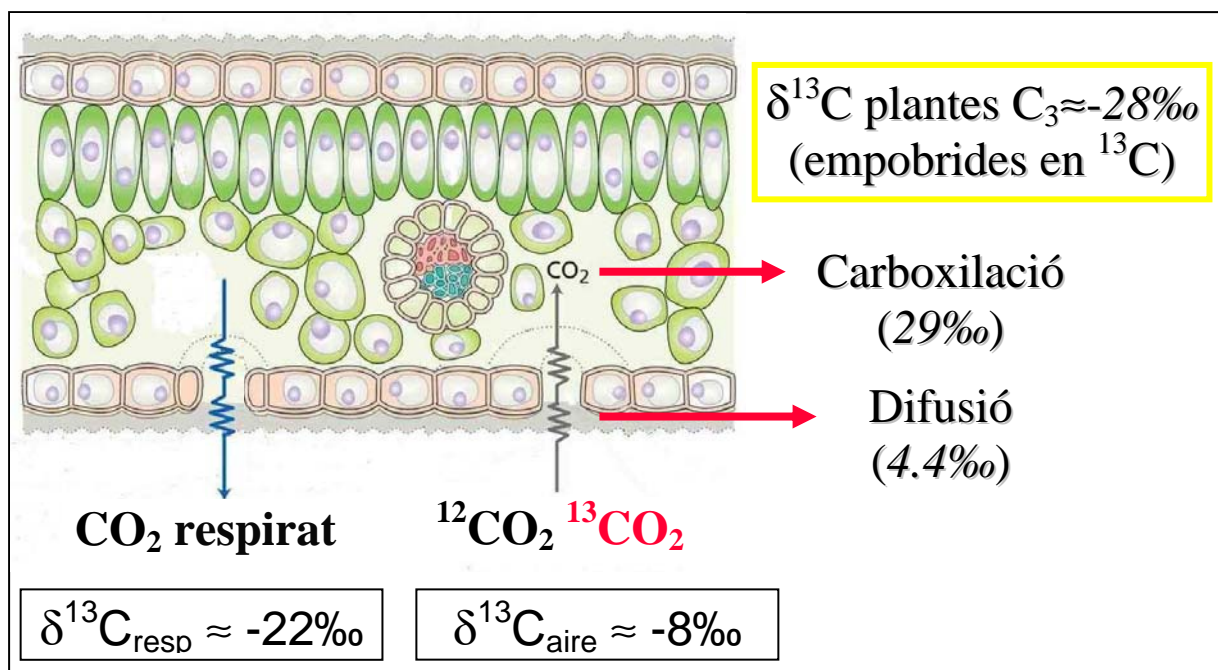


Figura 1.3.1. Discriminació isotòpica del carboni durant la fotosíntesi i la respiració en plantes C<sub>3</sub>.

El model simplificat de Farquhar *et al.* (1982) que es detalla a continuació només té en compte la discriminació isotòpica durant la difusió (a) i la carboxilació (b).

$$\Delta = a + (b - a) \cdot c_i / c_a$$



Segons aquest model, una reducció de la conductància estomàtica produiria, a través d'una disminució de la disponibilitat de CO<sub>2</sub> per la Rubisco (menor  $c_i/c_a$ ), un descens de la discriminació. S'ha comprovat que el model és molt consistent sota un ampli rang de condicions experimentals (Brugnoli *et al.* 1988, Brugnoli i Farquhar 2000), donant una forta correlació entre el  $c_i/c_a$  i la  $\delta^{13}\text{C}$  dels productes fotosintètics. És a dir, a major disponibilitat de CO<sub>2</sub>, la Rubisco té més possibilitat de poder triar el carboni que carboxila i, per tant, es produeix una major discriminació a favor del <sup>12</sup>C. En canvi, a mesura que la Rubisco va consumint el <sup>12</sup>CO<sub>2</sub>, el  $c_i$  disminueix i el restant es va enriquint en <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, de manera que la Rubisco perd capacitat de discriminació i es veu obligada a carboxilar més <sup>13</sup>C.

La fotosíntesi no és l'únic procés on es produeix una discriminació isotòpica del carboni. Així, alguns treballs recents han descrit fraccionament durant la respiració de foscor. S'ha observat en diverses espècies un fraccionament positiu de la respiració d'entre el 3 i el 6‰. És a dir, que la composició isotòpica ( $\delta^{13}\text{C}$ ) del CO<sub>2</sub> respirat està enriquida en <sup>13</sup>C en relació al als compostos de la fulla (Ghashghaie *et al.* 2003, Tcherkez *et al.* 2003, Nogués *et al.* 2004, Xu *et al.* 2004). Com s'ha descrit anteriorment, resulta poc habitual aquest tipus de fraccionament, a favor de l'isòtop més pesat, però es pot justificar per tres fenòmens. La primera causa és la naturalesa química del substrat respirat, ja que els diferents compostos (sucres, lípids, proteïnes i àcids orgànics) presenten diferents valors de  $\delta^{13}\text{C}$ . El segon motiu és la discriminació d'alguns enzims implicats en la respiració, com la piruvat deshidrogenasa (PDH, De Niro i Epstein 1977). I per últim, a causa d'una distribució no uniforme del <sup>13</sup>C en la molècula de glucosa. És a dir, el <sup>13</sup>C és més abundant a les posicions 3 i 4 de les hexoses, lloc de trencament preferent de la PDH (Tcherkez *et al.* 2003).

### 1. 3. 2. EL MARCATGE ISOTÒPIC: UNA EINA PER ESTUDIAR EL METABOLISME DEL CARBONI

A mitjans dels anys 50, es va realitzar el primer experiment de marcatge isotòpic per tal d'estudiar el metabolisme del carboni. Així, Melvin Calvin, Andrew Benson i James A. Bassham van dilucidar la ruta bioquímica de l'assimilació de CO<sub>2</sub> subministrant <sup>14</sup>C a cultius de l'alga *Chlorella* (Rabinowitch 1956). Se subministraven polsos de <sup>14</sup>C (radioactiu) que l'alga assimilava i després es feien caceres per determinar per autoradiografia quins compostos presentaven el marcatge.

Actualment es poden realitzar experiments de marcatge isotòpic sense necessitat de treballar amb isòtops radioactius. Això és possible gràcies a la gran evolució de les tècniques d'espectrometria de masses, que permeten un anàlisi molt precís de la  $\delta^{13}\text{C}$  de diferents tipus de mostres: sòlides, líquides i gasoses. La filosofia és la mateixa que als experiments de Calvin. És a dir, l'ús dels isòtops de carboni (estables en aquest cas,  $^{12}\text{C}$  i  $^{13}\text{C}$ ) com a traçadors. Així, se subministra un aire amb una  $\delta^{13}\text{C}$  diferent al de l'aire ambiental, de manera que el  $\text{CO}_2$  incorporat pel teixit durant aquest període tindrà una composició isotòpica distinta, diferenciar-se de l'assimilat amb anterioritat. Després del pols de marcatge es pot analitzar la matèria orgànica dels teixits o bé de compostos específics (sucres, lípids, proteïnes, àcids orgànics), però també l'aire fotosintetitzat o respirat (Tcherkez *et al.* 2003, Nogués *et al.* 2004). Actualment es combinen tècniques de marcatge isotòpic amb mesures de bescanvi de gasos. Per tant, poden oferir informació detallada de com i quant  $\text{CO}_2$  és assimilat, com es reparteix entre els diferents òrgans de la planta i com es respira aquest carboni. Una de les aplicacions amb més potencial és el seguiment dels compostos marcats, la qual cosa permet dilucidar amb detall les diferents vies metabòliques dels vegetals (Gebbing i Schnyder 2001, Schnyder *et al.* 2003, Nogués *et al.* 2004, Tcherkez *et al.* 2005)

## **2. OBJECTIUS**

---



## 2. OBJECTIUS

L'objectiu general de la Tesi és estudiar l'assimilació i la gestió del carboni a dues espècies de creixement lent, *Chamaerops humilis* i *Cycas revoluta*, i caracteritzar els efectes d'una exposició a llarg termini a CO<sub>2</sub> elevat que es produeixen en aquestes plantes. Aquest objectiu general es desglossa en els següents objectius específics:

- Determinar el tipus de metabolisme fotosintètic d'aquestes espècies.
- Caracteritzar les respostes fisiològiques al CO<sub>2</sub> elevat de les plantes de creixement lent a curt i llarg termini.
  - Determinar si es dona aclimatació fisiològica al CO<sub>2</sub> elevat en ambdues espècies, tant a nivell fotosintètic com respiratori.
  - Caracteritzar la resposta al CO<sub>2</sub> elevat del bescanvi de gasos del conjunt de la capçada.
  - Identificar l'efecte del CO<sub>2</sub> elevat sobre els punts de compensació de llum, CO<sub>2</sub> i temperatura.
- Quantificar els efectes del CO<sub>2</sub> elevat sobre la producció de biomassa en espècies de creixement lent.
- Estudiar la distribució del carboni recentment assimilat entre els diferents òrgans de la planta i com es veu modificada per una exposició a CO<sub>2</sub> elevat.
- Modelar la gestió del carboni assimilat per les fulles en plantes de creixement lent.
- Demostrar la viabilitat de l'ús de l'adobat carbònic com a eina de millora de la producció en cultius protegits sota condicions de clima mediterrani.



### **3. MATERIAL I MÈTODES**

---





### 3. MATERIAL I MÈTODES

#### 3. 1. MATERIAL VEGETAL

Les espècies vegetals estudiades van ser el margalló (*Chamaerops humilis* L., Fam. *Arecaceae*) i *Cycas revoluta* Thunb. (Fam. *Cycadaceae*), dues espècies de creixement lent. Es van utilitzar plantes d'un any d'edat provinents de llavor. Les plantes de margalló van créixer en contenidors d'1 L, en un substrat format per una barreja de torba i perleta en proporció 2:1 (v:v). En el cas de *Cycas*, les plantes es van cultivar en contenidors d'1 L, però es va utilitzar un substrat amb més drenatge, que contenia torba, escorça vegetal i sorra.

#### 3. 2. DISSENY EXPERIMENTAL I CONDICIONS DE CULTIU

Les plantes es van cultivar a les instal·lacions de l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) del Centre de Cabrils (Barcelona). Els contenidors es van ubicar sobre banquetes, en un hivernacle tipus multitúnel amb sostre circular, cobert amb plàstic de polietilè tèrmic (Fig. 3.2.1). L'hivernacle estava subdividit en mòduls independents d'aproximadament 80 m<sup>2</sup> (12 m x 6.5 m), a cadascun dels quals es van definir diferents nivells de CO<sub>2</sub>: 400 ppm (tractament ambiental, A) i 800 ppm (tractament elevada, E). La concentració elevada es va aconseguir mitjançant l'aplicació de CO<sub>2</sub> pur de qualitat alimentària des d'un tanc, la injecció del qual va ser controlada informàticament. L'aire de cada mòdul es va obtenir alternativament amb un programador industrial (PLS C20K, Omron, Kyoto, Japó) per determinar la concentració de CO<sub>2</sub> mitjançant un anàlisi de gasos a l'infraroig (IRGA, Lira 3600, MSA, Barcelona). El senyal de l'IRGA es va enviar a un ordinador que activava la injecció de CO<sub>2</sub> al mòdul elevat quan la concentració mesurada era inferior a 800 ppm. La infraestructura i el gas van ser subministrats per l'empresa Carburos Metálicos S. A. (Barcelona), a través d'Agrigas (<http://www.irta.es/agrigas/es/default.pdf>), una unitat mixta entre l'esmentada empresa i l'IRTA, dins el marc d'un conveni de col·laboració.

Es van cultivar 30 plantes de cadascun dels tractaments resultants del disseny, corresponents als 2 nivells de CO<sub>2</sub> (A i E) aplicats sobre les dues espècies estudiades (*Chamaerops humilis* i *Cycas revoluta*).



**Figura 3.2.1.** Interior de l'hivernacle amb les plantes de *Cycas revoluta* (esquerra) i *Chamaerops humilis* (dreta) a l'inici de l'experiment, en contenidors sobre les banquetes de cultiu.

El reg va ser localitzat, mitjançant goters, juntament al qual es va aplicar una solució nutritiva completa, amb un equilibri 1:0.5:1.5 (N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O; pH= 6.5).

L'assaig es va desenvolupar durant 20 mesos, des de desembre de 2002 fins a finals d'agost de 2004. Durant els períodes freds, l'hivernacle es va calefactar amb aerotermes per obtenir unes temperatures mínimes de 14°C. Ventilant, per mitjà de l'obertura de les finestres, es va evitar un excés de temperatura a l'interior de l'hivernacle. Lògicament, aquesta ventilació va tenir un cert efecte sobre la concentració de CO<sub>2</sub>, especialment a l'època estival (Figs. 4.3.1 i 4.3.2).

Es va fer un seguiment en continu de les condicions ambientals de l'hivernacle, és a dir, es enregistrar cada 10 minuts la temperatura, humitat relativa (Hobo H08-004-02, Onset Computer, Bourne MA, USA) i concentració de CO<sub>2</sub> de l'aire.

### 3. 3. MESURA DEL CREIXEMENT

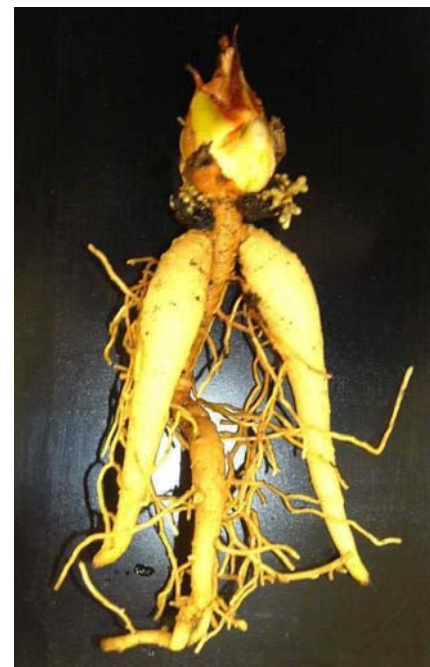
L'avaluació del creixement es va dur a terme mitjançant mesures destructives a tres moments de l'experiment (inici, 5 mesos i 20 mesos), així com amb mesures no destructives mensuals durant els primers 6 mesos de l'assaig.

#### 3. 3. 1. MESURES DESTRUCTIVES

Les mesures destructives es van realitzar a l'inici, als 5 mesos i al final de l'experiment (20 mesos). A cadascun dels tres moments es van seleccionar a l'atzar 10 individus de cada tractament, als quals prèviament se'ls va mesurar l'alçada de la part aèria, el diàmetre de la base de la tija (*Chamaerops humilis*) o el tronc (*Cycas revoluta*) i es va comptar el nombre de fulles. L'alçada es va obtenir amb un regle graduat i el diàmetre per mitjà d'un peu de rei amb una precisió de 0.01 mm (Mitutoyo, Kawasaki, Japó).

#### 3. 3. 1. 1. DETERMINACIÓ DE LA MATÈRIA SECA

El creixement es va analitzar mitjançant determinacions de la matèria seca dels diferents òrgans de les plantes. El material vegetal es va dividir en diferents fraccions segons l'espècie i el moment de mostreig. A *Chamaerops humilis* es van definir tres fraccions: fulles, tija i arrels. A *Cycas revoluta* l'anàlisi de les arrels va ser més exhaustiu, ja que es van diferenciar les arrels en funció del seu gruix (Fig. 3.3.1). Així, a tots els punts de mostreig es van estudiar les següents fraccions: fulles, tronc, arrels gruixudes i arrels fines. A més, al segon punt (5 mesos), es van separar les fulles segons la seva edat, en fulles joves i velles, per tal d'estudiar amb més profunditat l'aparició de fulles noves, un fenomen discontinu que es produeix només una o



**Figura 3.3.1.** Detall dels diferents tipus d'arrels a *Cycas revoluta*, gruixudes i fines.

unes poques vegades l'any (Stevenson 1980, Norstog i Nicholls 1997). Les fulles velles eren aquelles que estaven presents des de l'inici de l'experiment, mentre que les joves corresponien a les de nova formació, és a dir, durant l'aplicació del tractament.

Es va procedir a l'assecat del material en una estufa a 60°C fins a pes constant (unes 72 h). Posteriorment es va obtenir el pes sec de cada òrgan amb una balança de precisió de 0.1 mg (Mod. JK-10, Mettler Toledo, Barcelona). El pes sec de la part aèria, el pes sec de la part subterrània i el pes sec total es van determinar sumant les diferents fraccions.

### 3. 3. 1. 2. DETERMINACIÓ DE L'ÀREA I EL PES ESPECÍFIC FOLIAR (SLW)

L'àrea foliar es va quantificar mitjançant un integrador d'àrea foliar (DIAS, Delta-T Devices, Cambridge, UK). L'índex d'àrea foliar (LAI) es va calcular multiplicant l'àrea foliar per la densitat de plantació (20 plantes m<sup>-2</sup>).

El SLW (*Specific Leaf Weight*) és el quocient entre el pes sec de les fulles i la seva àrea, per tant, és un indicador del gruix foliar (g m<sup>-2</sup>). Es va calcular segons la següent equació:

$$SLW = \frac{PES\ SEC\ FULLES}{ÀREA\ FOLIAR}$$

### 3. 3. 1. 3. RELACIONS ENTRE FRACCIONS

La relació de pes foliar o LWR (*Leaf Weight Ratio*) informa, a partir del quocient entre la matèria seca de fulles i la total, sobre la proporció de biomassa que inverteixen les plantes en la formació de fulles. Les unitats en què s'expressa són g g<sup>-1</sup> i l'equació amb què es calcula és la següent:

$$LWR = \frac{PES\ SEC\ FULLES}{PES\ SEC\ PLANTA}$$

La relació de pes de la tija o el tronc (*Stem Weight Ratio*, SWR) i la d'arrels (*Root Weight Ratio*, RWR) indiquen la proporció de biomassa invertida en tija i en arrels. Per determinar-les es va fer servir la mateixa equació, però utilitzant els valors de matèria seca de la tija (o el

tronc) i les arrels enloc dels de fulla. També es va calcular el quocient part subterrània/part aèria (*Root/Shoot*).

### 3. 3. 1. 4. DETERMINACIÓ DE LA TAXA DE CREIXEMENT RELATIU (RGR)

El RGR (*Relative Growth Rate*) és un dels paràmetres més importants i clàssics de l'anàlisi del creixement, ja que reflexa la taxa d'increment relatiu de biomassa per unitat de temps. Es defineix com:

$$RGR = \frac{\ln PS_2 - \ln PS_1}{T_2 - T_1}$$

On  $PS_2$  i  $PS_1$  són respectivament el pes sec de la planta al final i a l'inici de cada període, mentre que  $T_2 - T_1$  correspon al temps transcorregut. Així, les seves unitats són  $g^{-1} \text{ dia}^{-1}$ .

Es va calcular el RGR dels diferents períodes de mostreig: 0 - 5 mesos, 5 - 20 mesos i també el del total de cultiu, 0 - 20 mesos. A cada període es va calcular el RGR del pes sec de cada òrgan (fulles, tiges i arrels), a més del RGR del pes sec total de la planta.

També es va obtenir el RGR de l'àrea foliar ( $\text{cm}^2 \text{ cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ ), substituint a l'equació anterior els valors de pes sec inicial i final pels d'àrea foliar. De manera anàloga es van obtenir el RGR de l'alçada ( $\text{cm cm}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ), del diàmetre de la tija ( $\text{cm cm}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) i del nombre de fulles ( $\text{n}^\circ \text{ fulles n}^\circ \text{ fulles}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ).

### 3. 3. 1. 5. PROPORCIÓ D'ESTIMULACIÓ DE LA BIOMASSA (BER) PEL CO<sub>2</sub> ELEVAT

El BER (*Biomass Enhancement Ratio*) és un indicador de l'efecte estimulador del CO<sub>2</sub> elevat sobre la producció de biomassa (Poorter i Pérez-Soba 2001). Es va calcular com el quocient de les mitjanes de biomassa de les plantes a CO<sub>2</sub> elevat i ambiental.

$$BER = \frac{PES SEC_{elevat}}{PES SEC_{ambiental}}$$

### 3. 3. 2. MESURES NO DESTRUCTIVES

A l'inici de l'experiment es van seleccionar a l'atzar 10 individus de cada tractament i espècie per fer un seguiment no destructiu del seu creixement durant els primers 6 mesos de cultiu, consistent en la mesura mensual de l'alçada, el diàmetre de la tija i el nombre de fulles.

Les mesures no destructives són un complement de les destructives, ja que aporten informació sobre els períodes intermedis de l'assaig, la qual cosa permet estudiar amb més profunditat l'evolució del creixement.

### 3. 3. 3. ESTUDI DE LA CINÈTICA DE CREIXEMENT

#### 3. 3. 3. 1. CORRELACIONS ENTRE MESURES DESTRUCTIVES I NO DESTRUCTIVES

Com s'ha comentat a l'apartat 3.1, prèviament a les mesures destructives, a cada punt de mostreig també es van mesurar sobre les mateixes plantes paràmetres no destructius (alçada, nombre de fulles i diàmetre de la tija o tronc). A partir de les dades obtingudes es van generar correlacions entre el pes sec i les variables no destructives mesurades a la mateixa planta, amb l'objectiu de trobar estimadors de la biomassa de les plantes, ràpids i que no impliquessin la mort dels individus. Les regressions no lineals es van obtenir amb el programa SigmaPlot (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

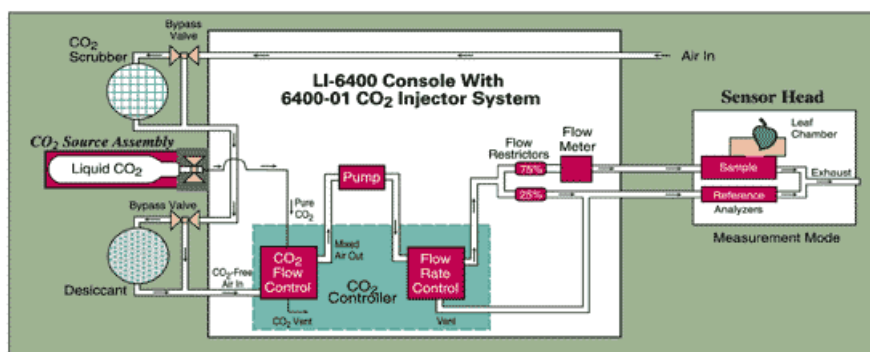
#### 3. 3. 3. 2. ESTIMACIONS DE BIOMASSA A PARTIR DE LES CORRELACIONS

Les correlacions obtingudes van permetre estimar la biomassa dels 10 individus seleccionats pel seguiment no destructiu a partir del seu diàmetre de tija (*Chamaerops*) o tronc (*Cycas*). Així, es va estudiar la cinètica de creixement dels diferents tractaments de manera no destructiva durant els primers 6 mesos d'aplicació de CO<sub>2</sub>.

### 3. 4. BESCANVI DE GASOS FOLIAR

Les mesures de bescanvi de gasos es van realitzar utilitzant el sistema obert de mesura Li-6400 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA), fent una anàlisi de gasos per infraroig (*Infra Red Gas Analyser*, IRGA), ja que tant el CO<sub>2</sub> com el vapor d'aigua absorbeixen a la banda de l'infraroig (Fig. 3.4.1). El sistema consta de dos sensors d'infraroig, un analitza l'aire de referència, és a dir, el que entra a la cambra on es col·loca la fulla, mentre que l'altre sensor mesura l'aire que en surt. D'aquesta manera es poden detectar les variacions d'aquests gasos causades pel metabolisme de la fulla. En un sistema obert, la taxa neta d'assimilació de CO<sub>2</sub> (*A*) és resultat, bàsicament, del diferencial de CO<sub>2</sub> entre l'entrada i la sortida de la cambra, el flux d'aire que hi circula i l'àrea foliar a l'interior de la pinça. D'altra banda, la taxa de transpiració (*E*) es calcula de manera similar, però mesurant l'aportació d'aigua a l'aire per la fulla. Integrant diverses mesures com la temperatura foliar i la de l'aire, s'obtenen altres paràmetres del bescanvi de gasos com són la conductància estomàtica (*g<sub>s</sub>*) o la concentració interna de CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>*) (von Caemmerer i Farquhar 1981).

El Li-6400 incorpora sistemes per controlar els principals paràmetres ambientals dins la cambra. Així, la [CO<sub>2</sub>] es regula gràcies a un sistema d'injecció de CO<sub>2</sub>. Mitjançant un díode emissor de llum (LED) es modula la densitat de flux fotònic fotosintètic (PPFD) incident sobre la fulla, gràcies a les mesures que ofereixen dos sensors de PAR, situats dintre i fora de la cambra. Pel que fa a la temperatura, es mesura amb un termoparell i un termistor (fulla i aire respectivament), mentre que la regulació es duu a terme gràcies a un ventilador, un *peltier* i una resistència. La humitat de l'aire es controla per mitjà d'un dessecant i la regulació del flux d'aire que circula a través del sistema.



**Figura 3.4.1.** Circuit d'aire de l'aparell de mesura de bescanvi de gasos per anàlisi a l'infraroig (Li- 6400, Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA).

Les mesures de bescanvi de gasos es van fer sobre 6 individus de cada espècie i tractament de CO<sub>2</sub> (A i E). Les fulles seleccionades, una per individu, van ser joves però totalment desenvolupades. Es van realitzar corbes de resposta al CO<sub>2</sub> mantenint durant les mesures la temperatura foliar a 25°C i el gradient de pressió parcial de vapor entre la fulla (VPD<sub>leaf</sub>) i l'aire al voltant de 1.3 kPa. Les corbes de resposta al CO<sub>2</sub> es van fer a un PAR de 1000 μmol Q m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, saturant per les fulles d'ambdues espècies. Les diferents concentracions de CO<sub>2</sub> a què es sotmetre les fulles van ser, per aquest ordre, 400, 300, 200, 100, 30, 400, 600, 800 i 1000 ppm de CO<sub>2</sub>, deixant entre cada mesura de 6 a 10 minuts d'estabilització i aclimatació a la nova [CO<sub>2</sub>].

La velocitat màxima de carboxilació o activitat *in vivo* de la Rubisco (V<sub>c,max</sub>) correspon al pendent de la part lineal de la corba A/c<sub>i</sub>, i es va calcular a partir dels 5 primers parells de punts de cada corba per cada individu (McMurtrie i Wang 1993; Ethier i Livingston 2004).

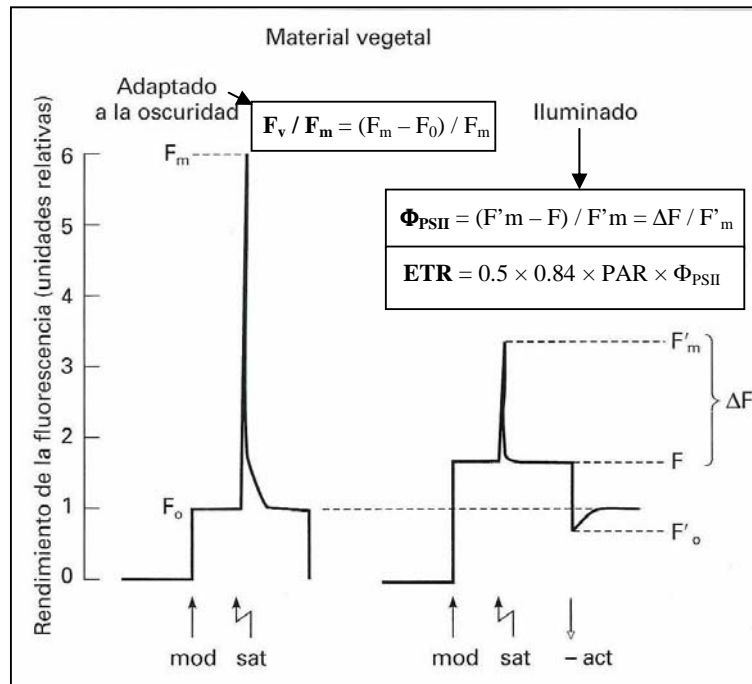
A partir dels últims punts de la corba, mitjançant una linealització de la plataforma es va calcular el transport electrònic màxim potencial que contribueix a la regeneració de la Ribulosa 1,5-bisfosfat (J<sub>max</sub>, McMurtrie i Wang 1993; Ethier i Livingston 2004).

Per a cada fulla analitzada, les corbes han permès obtenir altres paràmetres, com són la taxa de fotosíntesi amb llum saturant a CO<sub>2</sub> ambiental (A<sub>sat</sub>), la taxa màxima de fotosíntesi a llum i CO<sub>2</sub> saturants (A<sub>max</sub>), el punt de compensació de CO<sub>2</sub> (Γ) (von Caemmerer i Farquhar 1981), així com la limitació estomàtica a l'entrada de CO<sub>2</sub> (I) (Farquhar i Sharkey 1982)



### 3. 5. FLUORESCÈNCIA MODULADA DE LES CLOROFIL·LES

Les mesures de l'emissió de fluorescència es van realitzar simultàniament a les de bescanvi de gasos, per tant a les mateixes fulles i sota les mateixes condicions ambientals, utilitzant la cambra de fluorescència del Li-6400 (LFC 6400-40, Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA).



**Figura 3.5.1.** Cinètiques de la fluorescència de fulles adaptades a la foscor i a la llum (adaptat de Schreiber *et al.* 1994). **mod:** Llum modulada de mesura, **sat:** pols saturant de llum, **act.:** llum actínica.

La radiació lluminosa incident és absorbida a les membranes fotosintètiques de plantes superiors per part dels complexos proteïna-pigments de les antenes (*Light Harvesting Complexes* o LHC), associats als centres de reacció del fotosistema I (PSI) i el fotosistema II (PSII). En absorbir un fotó de llum, les clorofil·les de les antenes adquireixen l'estat de singlet excitat, l'energia de excitació del qual pot ser transferit als centres de reacció i generar un transport de electrons que oxida l'aigua i genera energia química en forma d'ATP i NADPH que s'usa per reduir el CO<sub>2</sub> (Allen *et al.* 1998, Azcón-Bieto *et al.* 2000). La dissipació de l'excés d'energia d'excitació es realitza per conversió a altres formes d'energia radiant no acumulable, com són l'emissió de fluorescència i calor. És a dir, l'energia lluminosa absorbida es distribueix entre diferents processos competitiu (fotoquímics, dissipació tèrmica i fluorescència), de manera que quan disminueix la dissipació fotoquímica, augmenten la

fluorescència i la dissipació tèrmica. Per això, l'emissió de fluorescència de les clorofil·les, tot i ser inferior al 5% de tota l'energia dissipada, ofereix informació sobre l'eficiència en la conversió d'energia radiant, la taxa de transport de electrons (ETR), el rendiment quàntic fotoelectroquímic del PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) o l'existència de fotoinhibició de la fotosíntesi (Fig. 3.5.1). Per això, és un mètode molt útil per complementar les dades obtingudes mitjançant tècniques de bescanvi gasós (Genty *et al.* 1989).

Els paràmetres obtinguts a partir de l'estudi de l'emissió de fluorescència van ser els següents:

- Rendiment quàntic relatiu del PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ). És una estimació de la probabilitat que té un fotó absorbit de generar un transport electrònic en ser utilitzat pel fotosistema II.
- Rendiment quàntic màxim del PSII ( $F_v / F_m$ ). És una estimació de la probabilitat màxima que té un fotó absorbit de generar un transport electrònic en ser utilitzat pel fotosistema II. Per això, s'aplica el flaix de llum saturant sobre la fulla en condicions de foscor i després d'una aclimatació a la foscor d'uns 30 minuts.

### 3. 6. BESCANVI DE GASOS DE LA CAPÇADA

#### 3. 6. 1. DESCRIPCIÓ DEL SISTEMA

El Servei de Camps Experimentals de la Universitat de Barcelona disposa d'un equipament que permet mesurar el bescanvi de gasos a escala de planta sencera (Casadesús 1995, Nogués *et al.* 2001) (Fig. 3.6.1). L'equip va ser dissenyat i construït pel Dr. Jaume Casadesús (actualment a l'IRTA), Josep Benet i el Dr. Luis Tapia el 1993. Com a anècdota històrica, citar que van aprofitar l'estructura d'unes cambres construïdes per Ricardo Simonneau i el Dr. Arturo Caballero l'any 1979. Per assolir part dels objectius de la tesi va ser necessari redissenyar certes parts del sistema en relació a l'equipament original. D'aquesta manera es van millorar algunes prestacions i es van afegir aplicacions a l'equip.



**Figura 3.6.1.** Imatge frontal de les cambres de mesura de bescanvi de gasos de la capçada amb plantes de *Cycas revoluta* a l'interior. La cambra de l'esquerra conté plantes cultivades a CO<sub>2</sub> ambiental i la cambra dreta plantes provinents de CO<sub>2</sub> elevat.

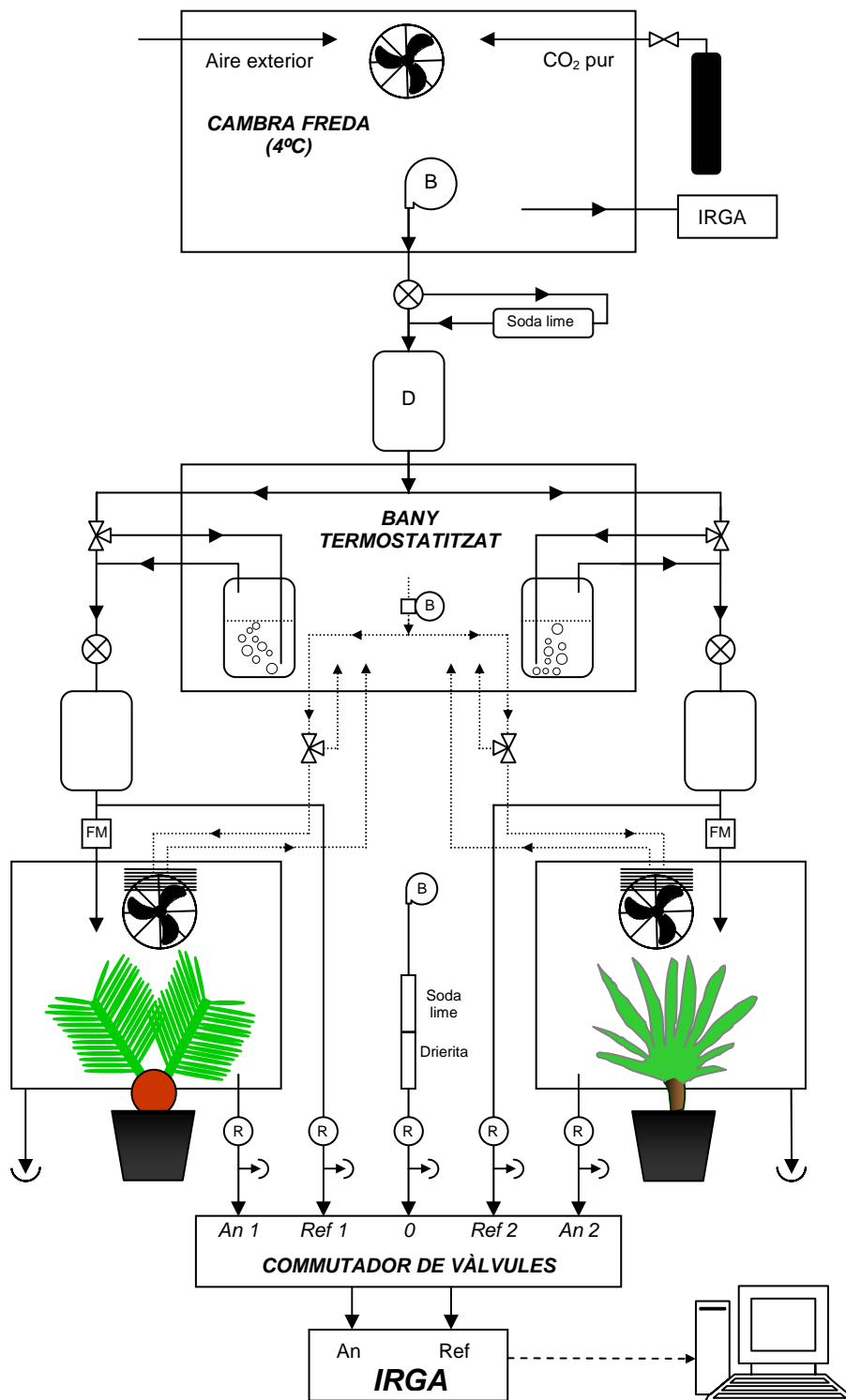
Aquest equip de mesura de bescanvi de gasos és similar als descrits per McCree (1986), Smart *et al.* (1994) o Cen *et al.* (2001). Tot i això, cal esmentar que aquest sistema incorpora característiques i aplicacions exclusives, que no s'han trobat descrites a la literatura, les quals es comenten bàsicament als apartats 3.6 i 3.7.

Es tracta d'un sistema de mesura en circuit obert format per dues cambres independents construïdes en plexiglàs transparent de 10 mm de gruix, amb un volum de 0.125 m<sup>3</sup> cadascuna (~ 0.5×0.5×0.5 m), a l'interior de les quals es genera un *steady-state* (Fig. 3.6.2). L'ambient de cada cambra es regula automàticament per ordinador segons unes consignes prèviament programades, de manera que es pot dividir el dia en múltiples períodes amb diferents condicions de PPFD, temperatura, humitat relativa i concentració de CO<sub>2</sub>.

La font il·luminació era independent a cada cambra. En aquests experiments va consistir en 4 làmpades halògenes de 500W (Model 64702, OSRAM S.A., Madrid), cadascuna de les quals aportava una intensitat d'uns 250 μmol Q m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Està situada uns 30 cm per sobre de les cambres, separada per un bany d'aigua refrigerat d'uns 7 cm que filtra part del infraroig i difon la radiació.

Cada cambra contenia un sensor integrat de temperatura i humitat relativa (HMP 112Y, Vaisala, Helsinki, Finlàndia). La regulació del dèficit de pressió parcial de vapor (VPD) de la cambra es va realitzar controlant la quantitat d'aigua present a l'aire d'entrada. L'aire, que provenia de l'exterior, es va fer circular a través d'una cambra freda (4°C), on es va refredar i assecar. Una bomba impulsava l'aire des de la cambra freda cap a cada cambra de mesura. Posteriorment, una part d'aquest aire sec es va fer passar a través d'un tanc bombollejador termostatitzat per humidificar-lo. A cada cambra, la proporció d'aire humit i aire sec va ser regulada per mitjà d'una vàlvula progressiva amb servoactuador (Model VXG 41.15R, Landis&Gyr Ltd., Ginebra, Suïssa) controlada per ordinador.

La temperatura de l'aire es va controlar automàticament fent circular aigua a través d'un bescanviador de calor a cada cambra. Es va refredar o calefactar ajustant la temperatura de l'aigua, però sense que mai estigués per sota del punt de rosada per evitar condensacions. La potència de refrigeració o calefacció es va modular amb uns vàlvules progressives com les del control del VPD, que van regular el flux d'aigua de circulació. La diferència de temperatura entre l'aire i una fulla representativa de la capçada es va mesurar a cada cambra amb dos termoparells invertits en sèrie (Model LI-600TC, Li-Cor Inc, Lincoln, NE, USA).



**Figura 3.6.2.** Diagrama general del sistema de mesura de bescanvi gasós en circuit obert a escala de planta sencera.

**B:** bomba, **FM:** fluxímetre de masses, **R:** rotàmetre, **D:** dipòsit estabilitzador

Circuit d'aire —> Circuit d'aigua .....>

El control del CO<sub>2</sub> a l'interior de la cambra es va realitzar regulant la concentració de CO<sub>2</sub> de l'aire d'entrada. Amb un IRGA (LCA-2, ADC Bioscientific, Hoddesdon UK) es va mesurar en continu la concentració de CO<sub>2</sub> a l'interior de la cambra freda i quan va ser inferior als nivells programats s'hi va injectar CO<sub>2</sub> pur de qualitat alimentària des d'una ampolla (Carbuos Metálicos, Barcelona). Dos potents ventiladors barrejaven l'aire, donant-hi una gran homogeneïtat, que juntament al gran volum de la cambra freda (60 m<sup>3</sup>) van conferir una gran estabilitat dels nivells de CO<sub>2</sub> de l'aire d'entrada a les cambres de mesura.

Abans de cada experiment es va fixar el flux d'aire circulant a través de cada cambra (entre 0.01 i 0.02 mol aire s<sup>-1</sup>) en funció de l'activitat de la biomassa vegetal, ajustant l'obertura d'unes vàlvules manuals prèvies a l'entrada de l'aire. En cada cas, es va determinar aquest flux diàriament mesurant el temps de desplaçament d'una bombolla de sabó a través d'un cilindre transparent de volum graduat (WHO 1984).

Cada cambra contenia un ventilador que barrejava ràpidament l'aire d'entrada amb la resta d'aire de la cambra. La velocitat del ventilador es va ajustar per fixar la conductància de la capa límit (*boundary layer*) al voltant dels 700 mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, que es va estimar per mitjà de mesures de balanç tèrmic amb làmines d'alumini (Jones 1992).

Un IRGA (Li-6262, Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA) configurat en mode diferencial va registrar seqüencialment la diferència de CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O entre la entrada i sortida de cada cambra. Com a referència es va utilitzar aire sec i sense CO<sub>2</sub>. Així, un sistema de vàlvules solenoide de 3 vies (Model FT 8320 85, ASCO, Scherpenzeel, Holanda) controlat per ordinador va commutar quin dels 3 canals es va mesurar en cada moment (canals de referència, diferencial cambra 1 i diferencial cambra 2). Per tal d'assegurar unes necessàries condicions d'*steady-state*, es va deixar un mínim de 3 minuts d'estabilització entre cada punt de mesura abans d'enregistrar la lectura.

Bàsicament, a partir d'aquestes mesures i el flux d'aire circulant es van obtenir en continu (cada 10 minuts) els paràmetres de bescanvi gasós calculats segons el model von Caemmerer i Farquhar (1981): fotosíntesi neta, transpiració i conductància foliar. Totes les dades es van obtenir en referència al conjunt de biomassa de la capçada (*canopy*). En finalitzar els experiments, es va determinar de manera destructiva l'àrea foliar i el pes sec de l'interior de les cambres i es van expressar les taxes per unitat d'àrea foliar o pes sec. En tractar-se

d'espècies de creixement molt lent ( $RGR < 0.004 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) es va assumir que l'increment de biomassa aèria a l'interior de les cambres durant l'experiment va ser menyspreable.

Els senyals analògics captats pel conjunt de sensors de l'equip es van monitoritzar i enregistrar en continu amb un ordinador a través d'una xarxa de targetes de comunicació analògico-digitals (Adam 4018 i Adam 4520, Advantech Co, Taipei, Taiwan). Un software elaborat pel Dr. Jaume Casadesús va gestionar tot el procés: programació de les condicions ambientals, adquisició i enregistrament de dades procedents dels sensors, així com el control dels sistemes de regulació, que van actuar quan la mesura dels sensors era diferent a la consigna programada.

A cada experiment, es va introduir tota la part aèria de 4 plantes a cada cambra, amb la mateixa densitat de plantació que van tenir durant el cultiu en hivernacle ( $20 \text{ plantes m}^{-2}$ ). Com a base de les cambres es va utilitzar plàstic flexible, envoltat per un marc d'alumini que es va fixar a l'estructura amb cargols. La part aèria de les plantes es va introduir a les cambres per uns orificis al plàstic flexible, que es van segellar amb massilla plàstica de fontaneria (Ref. 08568, 3M, Madrid) per tal de tancar hermèticament les cambres. La part subterrània va quedar fora de les cambres, la qual cosa va permetre regar les plantes diàriament amb una solució nutritiva completa durant els experiments.

Totes les mesures es van realitzar de manera simultània sobre plantes crescudes a hivernacle a concentració de  $\text{CO}_2$  ambiental (A) i elevat (E), ubicant un tractament a cada cambra.

### 3. 6. 2. ANÀLISI DELS CICLES DIARIS

Per mitjà de les cambres es va caracteritzar en continu el bescanvi de gasos de la capçada al llarg de cicles diaris. El fotoperíode es va fixar en 14 h de llum i 10 h de foscor. L'evolució diària de la intensitat de radiació es va simular encenent (i apagant) de manera progressiva i automatitzada els focus de les cambres. Així, es van definir 8 períodes al llarg del cicle diari, segons nombre de làmpades enceses (Taula 3.6.1).

Un cop introduïts 4 individus de cada tractament (A i E) a cada cambra, es va procedir a una aclimatació prèvia de les plantes durant 3 dies a les condicions de les cambres.

**Taula 3.6.1.** Períodes en què es va dividir el dia al llarg del cicle diari durant les mesures a les cambres i correspondència amb la intensitat de radiació mesurada a nivell de planta.

<i>Hora</i>	<i>Període</i>	<i>Nº làmpades enceses</i>	<i>PPFD <math>\mu\text{mol Q m}^{-2} \text{s}^{-1}</math></i>
08:00 – 10:00	Inici matí	1	~ 250
10:00 – 12:00	Matí	2	~ 500
12:00 – 14:00	Final matí	3	~ 700
14:00 – 16:00	Migdia	4	~ 900
16:00 – 18:00	Inici tarda	3	~ 700
18:00 – 20:00	Tarda	2	~ 500
20:00 – 22:00	Final Tarda	1	~ 250
22:00 – 08:00	Nit	0	0

Posteriorment, es va sotmetre les plantes a cicles diaris sota diferents condicions de temperatura (25 i 35°C) i concentració de CO<sub>2</sub> (400 i 800 ppm). Per tant, es van realitzar 8 tipus de cicles diaris, 4 per espècie, combinant temperatura i CO<sub>2</sub>. Així, es va caracteritzar la resposta del bescanvi de gasos de la capçada sota totes aquestes condicions per separat de plantes prèviament aclimatades (E) i no aclimatades (A) a CO<sub>2</sub> elevat. És a dir, en total 16 grups de cicles diaris (Taula 3.6.2).

Per evitar confusions, s'ha diferenciat la nomenclatura referent a la concentració de CO<sub>2</sub> de creixement a hivernacle, anomenada A o E, de la concentració de CO<sub>2</sub> a què s'han realitzat algunes mesures, on s'ha optat per utilitzar el valor numèric de concentració (400 o 800 ppm). És a dir, els tractaments A i E donen informació sobre els efectes indirectes o a llarg termini del CO<sub>2</sub> elevat, mentre que 400 i 800 ppm sobre els efectes directes o immediats.

Les plantes es van mantenir a les condicions definides per cada grup de cicles diaris durant 4 dies consecutius. D'aquesta manera es va poder estimar el balanç de carboni i la producció neta diària a escala d'individu d'una forma molt més precisa que amb els equips de mesura de bescanvi de gasos convencionals, basats en mesures puntuals d'una petita fracció d'individu i, en moltes ocasions, sense control de l'ambient dins la cambra. Els principals paràmetres obtinguts d'aquests cicles van ser la taxa neta d'assimilació de CO<sub>2</sub> (*A*), la taxa de transpiració (*E*), la conductància estomàtica (*g<sub>s</sub>*) i la taxa de respiració mitocondrial (*R<sub>D</sub>*). A partir



d'aquests dades es van calcular les integrals diàries d'assimilació neta de CO<sub>2</sub> i de respiració, així com l'eficiència en l'ús de l'aigua (WUE) de tota la capçada.

**Taula 3.6.2.** Esquema dels diferents cicles diaris que es van caracteritzar amb les cambres de bescanvi de gasos de la capçada. A: Tractament Ambiental, E: Tractament Elevat.

<b>Espècie</b>	<b>Hivernacle</b>	<b>T<sup>a</sup> (°C)</b>	<b>CO<sub>2</sub> (ppm)</b>
<i>Chamaerops humilis</i>	A	25	400
			800
		35	400
			800
	E	25	400
			800
		35	400
			800
<i>Cycas revoluta</i>	A	25	400
			800
		35	400
			800
	E	25	400
			800
		35	400
			800

### 3. 6. 3. CORBES DE RESPOSTA A LA LLUM

#### 3. 6. 3. 1. RESPOSTA FOTOSINTÈTICA DE LA CAPÇADA A LA LLUM

La resposta fotosintètica de la capçada a la llum es van realitzar a 12 intensitats de radiació entre 0 i 900  $\mu\text{mol Q m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Els diferents nivells de llum es van obtenir en funció del nombre de focus connectats, així com per mitjà de la interposició de xarxes metàl·liques d'ombreig amb diferents coeficients d'extinció.

Es van realitzar sota les mateixes condicions que els cicles diaris descrits anteriorment, és a dir, un total de 16 corbes. Per cada espècie i tractament de  $\text{CO}_2$  (A i E) es van obtenir sota 4 combinacions ambientals: concentració de  $\text{CO}_2$  (400 i 800 ppm) i temperatura (25 i 35°C).

#### 3. 6. 3. 2. ESTIMACIÓ DE LA TAXA DE RESPIRACIÓ MITOCONDRIAL A LA LLUM

L'evolució del  $\text{CO}_2$  a la llum és resultat de com a mínim quatre processos, els quals tenen lloc amb diferents taxes: fotosíntesi, fotorespiració, respiració mitocondrial a la llum ( $R_L$ ) i refixació del  $\text{CO}_2$  respirat (Villar 1994). Per això, aconseguir estimar  $R_L$  resulta difícil. Bàsicament, existeixen dos mètodes per estimar  $R_L$  mitjançant tècniques de bescanvi de gasos, el mètode de Laisk i el mètode de Kok.

El mètode de Laisk (1977) es basa en l'anàlisi de corbes  $A/c_i$  realitzades a diferents intensitats lumíniques. El punt de tall d'aquestes corbes es dona a nivells baixos de  $c_i$  i correspon a la situació en què la taxa de fotosíntesi és igual a la de fotorespiració. Així, s'assumeix que l'emissió de  $\text{CO}_2$  en aquest punt és igual a la taxa de respiració a la llum ( $R_L$ ), mentre que el valor de  $c_i$  correspon al punt de fotocompensació de  $\text{CO}_2$  ( $\Gamma^*$ ).

El mètode Kok (1948) es basa en l'anàlisi de la resposta de la fotosíntesi a baixes intensitats de llum. A nivells baixos de radiació, la fotosíntesi disminueix de manera lineal a mesura que es redueix la intensitat de llum, però prop del punt de compensació lumínic es produeix un increment en el pendent de la corba, causat per una disminució de l'assimilació neta de  $\text{CO}_2$ . Aquest fenomen s'anomena efecte Kok. La taxa de respiració a la llum s'estima extrapolant la secció lineal de la corba d'abans del canvi de pendent fins al punt de tall amb l'eix d'ordenades, és a dir, a intensitat lumínica zero. El valor d'assimilació neta de  $\text{CO}_2$  en aquest punt correspon a  $R_L$ .

Per dos motius, la taxa de respiració a la llum es va estimar segons el mètode Kok. En primer lloc, aquest mètode permet calcular  $R_L$  a diferents concentracions de  $CO_2$ , de manera que es va poder estudiar l'efecte directe del  $CO_2$  sobre la respiració a la llum. En segon lloc, per dificultats metodològiques amb el mètode Laisk. El model de von Cammerer i Farquhar (1981) està desenvolupat per fulles planes, per això el càlcul del  $c_i$  a nivell de la capçada resultaria poc rigorós.

Així, es va obtenir l'estimació de  $R_L$  a partir de les corbes A/PAR. Per cada corba es va analitzar la fotosíntesi a 9 intensitats de radiació corresponents a la part lineal de resposta, és a dir, per sota de  $250 \mu mol Q m^{-2} s^{-1}$ . Per ambdues espècies, es van estudiar els efectes directes i indirectes del  $CO_2$  elevat, així com de la temperatura sobre la respiració a la llum.

### 3. 6. 4. DETERMINACIÓ DELS PUNTS DE COMPENSACIÓ

Amb les cambres de mesura de bescanvi gasós es va determinar el punt de compensació lumínic, el punt de compensació de  $CO_2$  i el punt de compensació tèrmic de la capçada.

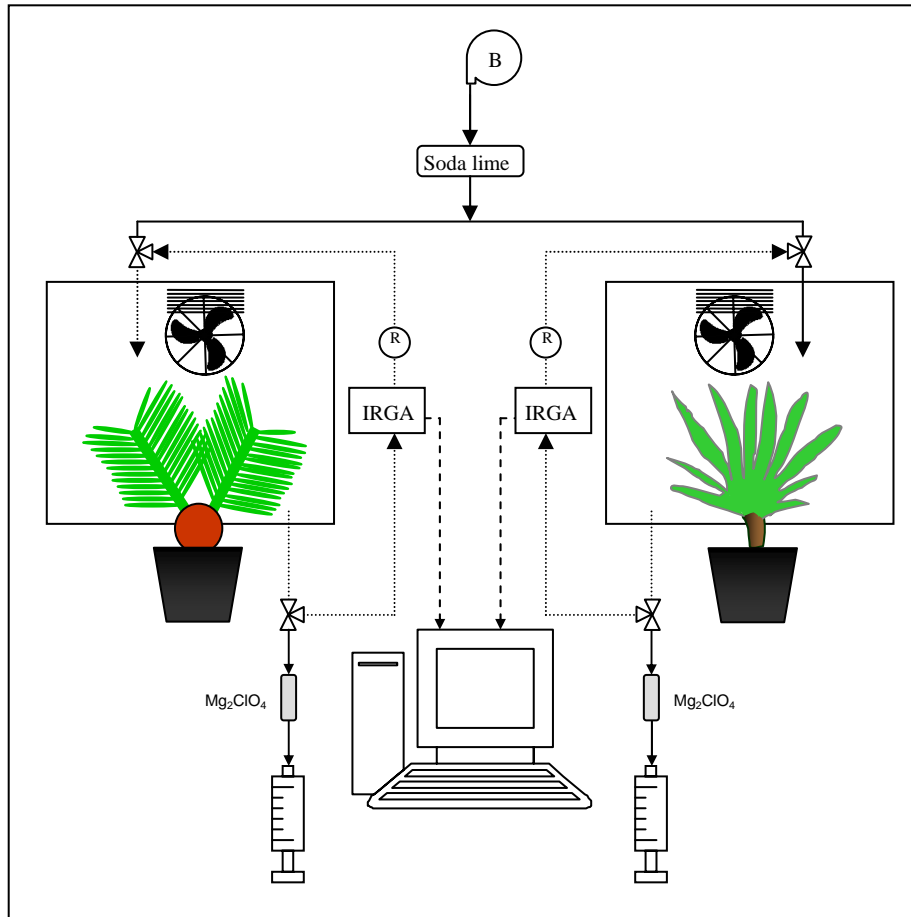
#### 3. 6. 4. 1. PUNT DE COMPENSACIÓ LUMÍNIC

A partir de les corbes de resposta de la fotosíntesi neta a la llum descrites a l'apartat anterior es va obtenir el punt de compensació lumínic. Per tant, s'obté a partir del punt de tall de la corba amb l'eix d'abscisses. Es tracta de la intensitat de radiació que produeix una taxa d'assimilació neta de  $CO_2$  igual a 0.

Igual que amb altres paràmetres, en aquest cas també es va obtenir per ambdues espècies, en plantes A i E, a 25 i 35°C, i a 400 i 800 ppm de  $CO_2$ .

#### 3. 6. 4. 2. PUNT DE COMPENSACIÓ DE $CO_2$

El punt de compensació de  $CO_2$  és la concentració de  $CO_2$  que produeix una taxa d'assimilació neta de  $CO_2$  nul·la. Es pot determinar mitjançant dues metodologies, l'estimació a partir de corbes de resposta al  $CO_2$  o bé per mesura directa en un sistema tancat.



**Figura 3.6.3.** Esquema simplificat del sistema de les cambres, que permeten treballar en circuit obert i tancat.

El punt de compensació de  $CO_2$  es va mesurar realitzant una modificació del disseny de les cambres de mesura de bescanvi gasós de la capçada perquè poguessin funcionar en circuit tancat (Fig. 3.6.3). En primer lloc, es va fer circular aire sense  $CO_2$  ( $CO_2$ -free air) en circuit obert a través de les cambres per tal de disminuir-hi la concentració de  $CO_2$ , amb l'objectiu d'apropar-se de manera ràpida al punt de compensació. D'aquesta manera, un cop tancat el sistema la determinació es va realitzar en pocs minuts amb un IRGA (LCA-2, ADC Bioscientific, Hoddesdon UK) connectat al circuit. Així es va evitar una situació estressant per les plantes, ja que la intensitat de radiació era saturant, a més reduir al màxim el risc de condensació a l'interior de les cambres o a l'IRGA.

Es va mesurar el punt de compensació de  $CO_2$  a 25 i 35°C, en plantes d'ambdues espècies i tractaments de  $CO_2$ .

### 3. 6. 4. 3. PUNT DE COMPENSACIÓ TÈRMIC

La resposta de l'activitat d'un procés metabòlic a la temperatura té una fase inicial d'increment exponencial (Llei de van't Hoff), un interval òptim i una fase decreixent corresponent a la desnaturalització de proteïnes. A més, cada procés presenta una corba de resposta particular, com succeeix en el cas de la fotosíntesi, respiració o fotorespiració. En general, els processos respiratoris tenen una temperatura òptima i màxima superior al de la fotosíntesi (Larcher 2003). Per tot això, en augmentar progressivament la temperatura, l'assimilació neta de CO<sub>2</sub> disminueix a partir d'un cert punt. El punt de compensació tèrmic correspon al valor de temperatura on s'anul·la la fotosíntesi neta.

El punt de compensació tèrmic es va determinar incrementant la temperatura de les cambres de mesura de bescanvi de gasos fins que l'assimilació neta de CO<sub>2</sub> es va compensar pels processos respiratoris. Així, es va obtenir sobre plantes A i E de les dues espècies, a 400 i a 800 ppm de CO<sub>2</sub>. Els casos en què la fotosíntesi neta no s'havia anul·lat totalment en arribar a 55°C, es va obtenir el punt de compensació tèrmic per extrapolació de la corba de resposta a la temperatura.

### 3. 7. MÈTODES DE MARCATGE ISOTÒPIC DE CARBONI ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ )

El marcatge isotòpic de carboni es va dur a terme alterant la composició isotòpica del carboni del  $\text{CO}_2$  de l'aire on van créixer les plantes. Concretament es va marcar amb  $^{12}\text{C}$ , és a dir, amb un aire més empobrit en  $^{13}\text{C}$ . Es van realitzar dos tipus de marcatge, de llarga durada i curta durada, que es van diferenciar principalment en el temps d'exposició de les plantes.

#### 3. 7. 1. MARCATGE ISOTÒPIC DE CARBONI DE LLARGA DURADA

El marcatge isotòpic de carboni de llarga durada o marcatge a llarg termini es va realitzar a les instal·lacions de l'IRTA, i va tenir lloc durant els 20 mesos de cultiu en hivernacle.

La composició isotòpica del carboni ( $\delta^{13}\text{C}$ ) del  $\text{CO}_2$  de l'aire mesurada a l'IRTA de Cabrils (Barcelona), va ser de  $-12.8 \pm 0.3\%$ . A molts treballs, sense mesurar directament l'aire, s'assumeix que la seva  $\delta^{13}\text{C}$  és de  $-8.0\%$ , segons el valor descrit per Farquhar *et al.* (1989). Però, tot i ser complex, resulta essencial realitzar l'anàlisi de la  $\delta^{13}\text{C}$  de l'aire i obtenir un valor de referència fiable. Com es pot observar, en cas d'haver assumit al nostre experiment una  $\delta^{13}\text{C}$  de l'aire de  $-8.0\%$  l'error comès hauria estat molt important.

Com s'ha descrit anteriorment, a l'experiment d'increment de  $\text{CO}_2$  a l'hivernacle es va injectar  $\text{CO}_2$  pur des d'un tanc. La  $\delta^{13}\text{C}$  del gas aplicat era bastant diferent a la de l'aire. Concretament, es va afegir  $\text{CO}_2$  empobrit en  $^{13}\text{C}$ , amb una  $\delta^{13}\text{C}$  d'aproximadament  $-32.0\%$ . Així, en injectar  $\text{CO}_2$  es van alterar de manera simultània tant la concentració com la  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  de l'aire durant 20 mesos. La variació de la  $\delta^{13}\text{C}$  de l'aire va ser proporcional a la quantitat de  $\text{CO}_2$  aplicat i per tant molt relacionada amb la concentració de  $\text{CO}_2$ . Per això, es va analitzar la  $\delta^{13}\text{C}$  de mostres d'aire de l'hivernacle amb diferents concentracions de  $\text{CO}_2$  (entre 400 ppm i 800 ppm), amb l'objectiu d'obtenir la correlació entre la concentració de  $\text{CO}_2$  i  $\delta^{13}\text{C}$  de l'aire. Per mitjà d'aquesta relació, es va estimar la  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  de l'aire de cada tractament (A i E) a partir de la concentració de  $\text{CO}_2$ . Per tal d'aconseguir aquesta concentració de  $\text{CO}_2$  es van analitzar els registres de  $\text{CO}_2$  dels 20 mesos de cultiu. Es van descartar les lectures corresponents als períodes nocturns i es va obtenir la mitjana de concentració de  $\text{CO}_2$  de la resta de dades, corresponent als moments del dia en què va tenir lloc d'assimilació de  $\text{CO}_2$  (Taula 4.3.1).

Així, el CO<sub>2</sub> assimilat per les plantes del mòdul E durant els 20 mesos de cultiu estava isotòpicament marcat. D'aquesta manera es va poder seguir la repartició entre els diferents òrgans de la planta del carboni assimilat per les fulles.

### 3. 7. 2. MARCATGE ISOTÒPIC DE CARBONI DE CURTA DURADA

El marcatge isotòpic de carboni de curta durada es va realitzar a les cambres de bescanvi de gasos de la capçada descrites a l'apartat 3. 6., que es troben ubicades al Servei de Camps Experimentals de la Universitat de Barcelona.

Les cambres incorporen un sistema que permet alterar la  $\delta^{13}\text{C}$  de l'aire: es va modificar l'aire que entrava a les cambres, barrejant aire atmosfèric de l'exterior del Servei de Camps Experimentals ( $\delta^{13}\text{C}=-12.1\pm 0.2\%$ ) amb CO<sub>2</sub> pur d'ampolla ( $\delta^{13}\text{C}=-35.4\pm 0.1\%$ ). La  $\delta^{13}\text{C}$  de la barreja d'aire durant aquest marcatge va ser de  $-22.9\pm 0.1\%$ . Així, es va marcar isotòpicament durant 4 dies complets el carboni assimilat per tota la part aèria de 4 plantes, que era el material vegetal introduït a cada cambra de mesura.

El marcatge de curta durada va tenir lloc al final de l'experiment, és a dir, després de 20 mesos de cultiu en hivernacle. Es va aplicar sobre plantes marcades i no marcades prèviament amb el marcatge de llarga durada.

El protocol que es va seguir a cada experiment de marcatge a curt termini va ser el següent:

- Determinació de la  $\delta^{13}\text{C}$  del CO<sub>2</sub> respirat a la foscor per la capçada abans de començar el marcatge.
- Determinació de la  $\delta^{13}\text{C}$  de la matèria orgànica de la capçada abans del marcatge.
- Marcatge durant 4 dies amb un aire de  $\delta^{13}\text{C}$  modificada ( $-22.9\%$ ).
- Determinació de la  $\Delta_o$  *on line* a la llum durant l'assimilació del CO<sub>2</sub> marcat.
- Determinació de la  $\delta^{13}\text{C}$  del CO<sub>2</sub> respirat a la foscor durant i al final del marcatge.
- Determinació de la  $\delta^{13}\text{C}$  de la matèria orgànica de la capçada durant i al final del marcatge.
- Quantificació del carboni assimilat durant el marcatge.
- Càlcul del % de carboni respirat que prové del recentment assimilat.

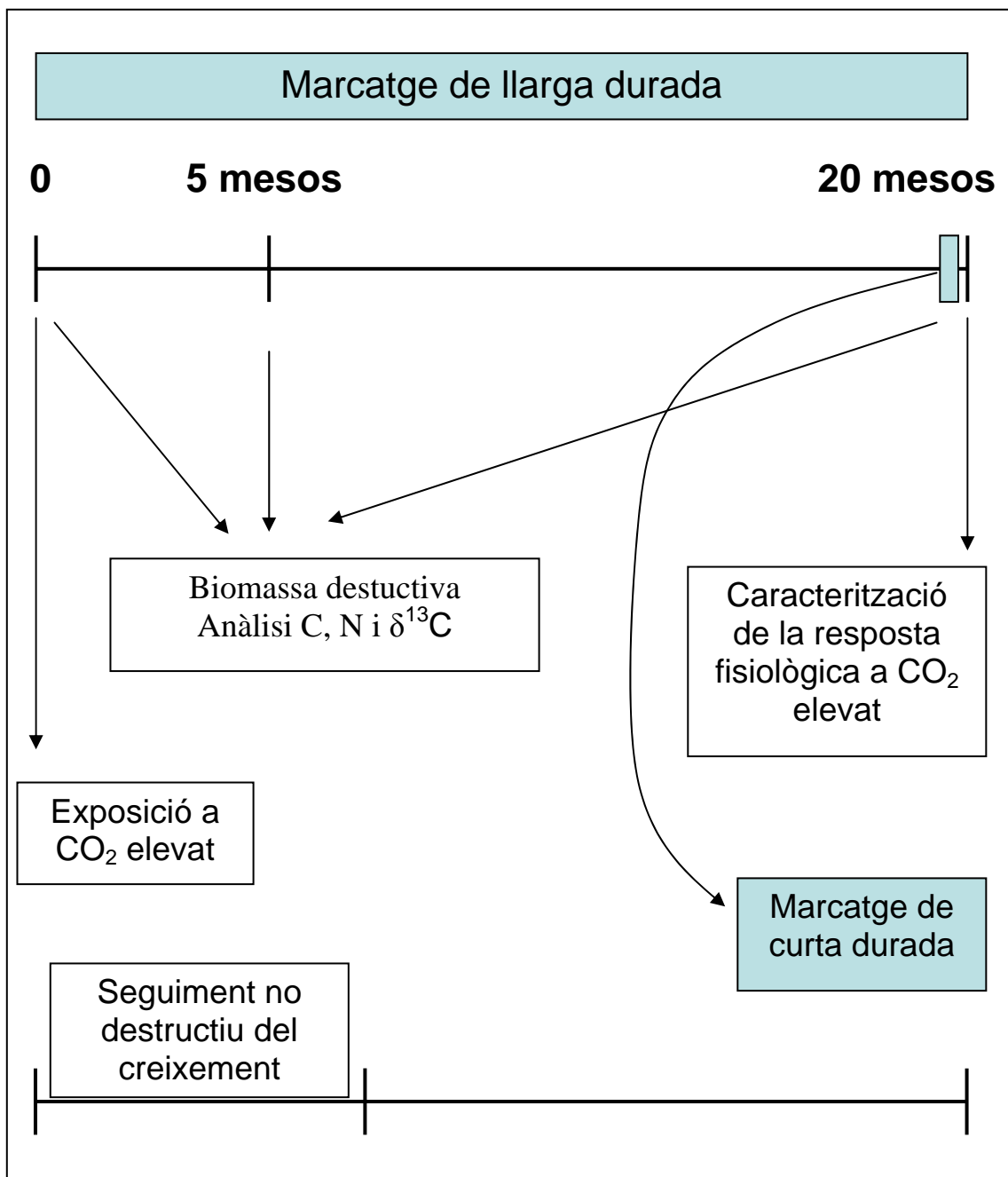


Figura 3.7.1. Esquema general del calendari d'experiments i mesures realitzades.



### 3. 7. 2. 1. DETERMINACIÓ DE LA $\delta^{13}\text{C}$ DEL $\text{CO}_2$ PRODUÏT A LA RESPIRACIÓ

En condicions de foscor es va fer circular aire sense  $\text{CO}_2$  ( $\text{CO}_2$ -free air) en circuit obert a través de les cambres fins reduir la concentració interior a un nivell residual constant (unes 10 ppm), provinent de la pròpia respiració de la capçada. En aquest punt, es va tancar el sistema i es va deixar que s'acumulés el  $\text{CO}_2$  produït per la capçada a l'interior de les cambres. La concentració de  $\text{CO}_2$  es va mesurar amb un IRGA (LCA-2, ADC Bioscientific, Hoddesdon UK) connectat al circuit tancat (Fig. 3.6.3). Quan el nivell de  $\text{CO}_2$  mesurat va arribar a unes 300 ppm es van prendre mostres d'aire de les cambres, per tant tot el  $\text{CO}_2$  provenia únicament de la respiració de la capçada.

Tant el mostreig com l'anàlisi de la  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  l'aire respirat es detallen als apartats 3.8.1.1 i 3.8.1.2, respectivament.

### 3. 7. 2. 2. DETERMINACIÓ DE LA $\Delta_o$ DURANT LA FOTOSÍNTESI

La discriminació fotosintètica del carboni de tota la capçada es va mesurar amb les cambres, funcionant en circuit obert, segons Evans *et al.* (1986):

$$\Delta_o = \xi \cdot \frac{\delta_o - \delta_e}{1 + \delta_o - \xi \cdot (\delta_o - \delta_e)} \quad \text{on} \quad \xi = \frac{c_e}{c_e - c_o}$$

$\delta_e$  i  $\delta_o$  són les composicions isotòpiques del  $\text{CO}_2$  de l'aire d'entrada i sortida a la cambra, respectivament, mentre que  $c_e$  i  $c_o$  corresponen a les concentracions de  $\text{CO}_2$  de l'aire d'entrada i sortida.

Les mesures es van realitzar a la màxima intensitat de radiació que permeten les cambres, uns  $900 \mu\text{mol Q m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , per tal d'obtenir una adequada activitat fotosintètica. La diferència de concentració de  $\text{CO}_2$  entre l'aire d'entrada i el de sortida es va determinar amb un IRGA com s'ha descrit a l'apartat 3.6.1. No obstant això, el flux de circulació d'aire a través de les cambres es va reduir per incrementar aquest diferencial, que es va situar al voltant de 100 ppm, amb l'objectiu d'obtenir la màxima resolució de les anàlisis isotòpiques.

El mostreig de l'aire d'entrada i sortida de les cambres es va realitzar segons l'apartat 3.8.1.1 i l'anàlisi de la seva  $\delta^{13}\text{C}$  segons l'apartat 3.8.1.2.

### 3. 7. 2. 3. QUANTIFICACIÓ DEL CARBONI ASSIMILAT DURANT EL MARCATGE

La mesura del bescanvi de gasos en continu durant tot el període de marcatge va permetre obtenir la integral d'assimilació de CO<sub>2</sub> i, per tant, determinar la quantitat de carboni marcat que va incorporar la capçada.

### 3. 7. 2. 4. CÀLCUL DEL % DE CARBONI NOU PRESENT AL CO<sub>2</sub> RESPIRAT

El CO<sub>2</sub> respirat per la capçada a la foscor després del marcatge prové del carboni antic (present als teixits abans del marcatge) i del carboni nou (fixat durant el marcatge). La proporció de carboni nou present al CO<sub>2</sub> respirat a la foscor ( $p$ ) va ser calculada a partir de mesures de la  $\delta^{13}\text{C}$  del CO<sub>2</sub> respirat (Nogués *et al.* 2004). Es va assumir que la  $\delta^{13}\text{C}$  resultant de la respiració del carboni antic ( $\delta_{old}$ ) es corresponia amb el valor de composició isotòpica del CO<sub>2</sub> respirat mesurat abans del marcatge ( $\delta_b$ ). D'altra banda, la composició isotòpica del CO<sub>2</sub> respirat provinent de l'oxidació del carboni nou ( $\delta_{new}$ ) està afectat per dos fenòmens de discriminació isotòpica: la discriminació fotosintètica ( $\Delta_o$ ), que està lligada a la composició isotòpica del CO<sub>2</sub> de marcatge ( $\delta_L$ ), i la discriminació de la respiració mitocondrial ( $e_{dark}$ ). Per tant, la  $\delta^{13}\text{C}$  del CO<sub>2</sub> respirat en un moment determinat ( $\delta_r$ ) s'obté a partir de la següent equació:

$$\delta_r = p \cdot \delta_{new} + (1 - p) \cdot \delta_{old}$$

I aplicant aquesta expressió als experiments de marcatge isotòpic obtenim:

$$\delta_f = p \cdot \frac{(\delta_L - \Delta_o)/(1 + \Delta_o) - e_{dark}}{1 + e_{dark}} + (1 - p) \cdot \delta_b$$

on  $\delta_f$  és la composició isotòpica del CO<sub>2</sub> respirat després del marcatge (final).

Així, la proporció de carboni nou present a la respiració ( $p$ ) es pot aïllar d'aquesta fórmula:

$$p = \frac{\delta_f - \delta_b}{\frac{(\delta_L - \Delta_o)/(1 + \Delta_o) - e_{dark}}{1 + e_{dark}} - \delta_b}$$

Nogués *et al.* (2004) proposa unes simplificacions que consisteixen en aproximar el terme  $((\delta_L - \Delta_O)/(1 + \Delta_O) - e_{dark})/(1 + e_{dark})$  a  $\delta_L - \Delta_O - e_{dark}$ , ja que  $\Delta_O$  i  $e_{dark}$  són petits en comparació a 1, i també considerar  $e_{dark} = 0$ , menyspreable en relació a  $\Delta_O$  i  $\delta_L$ . Si s'apliquen, el càlcul de  $p$  resulta molt més senzill:

$$p \approx \frac{\delta_f - \delta_b}{\delta_L - \Delta_O - \delta_b}$$

No obstant, no es va considerar adequat dur a terme aquestes simplificacions pel càlcul de  $p$  a les espècies estudiades, ja que en aquest cas les variacions introduïdes eren importants.

### 3. 8. MESURES ISOTÒPIQUES I ANÀLISI ELEMENTAL

Es van realitzar anàlisis de diferents tipus de mostres: gasos i matèria orgànica dels teixits vegetals. En el cas de les mostres gasoses, es va determinar la composició isotòpica del carboni ( $\delta^{13}\text{C}$ ) del  $\text{CO}_2$ . A la matèria orgànica dels teixits es van determinar les composicions isotòpiques del carboni ( $\delta^{13}\text{C}$ ) i del nitrogen ( $\delta^{15}\text{N}$ ), així com els continguts en nitrogen i en carboni. Totes aquestes anàlisis es van realitzar a la Unitat de Cromatografia de Gasos-Espectrometria de Masses Aplicada dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

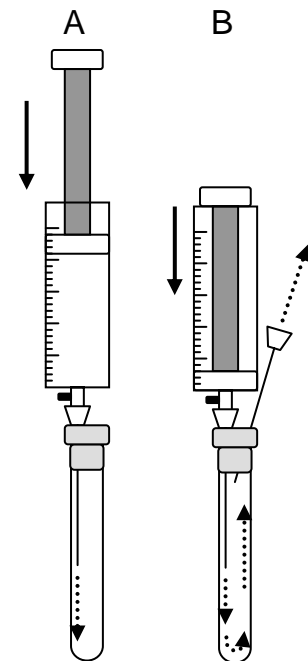
#### 3. 8. 1. DETERMINACIÓ DE LA COMPOSICIÓ ISOTÒPICA DEL CARBONI ( $\delta^{13}\text{C}$ ) DEL $\text{CO}_2$

##### 3. 8. 1. 1. SISTEMA DE MOSTREIG DE GASOS

Es van obtenir diferents tipus de mostres gasoses per determinar la composició isotòpica del  $\text{CO}_2$ :

- Aire de creixement als mòduls de l'hivernacle
- Aire d'entrada i sortida a les cambres de bescanvi de gasos (sistema obert)
- Aire que conté el  $\text{CO}_2$  respirat (sistema tancat)
- $\text{CO}_2$  pur de subministrament (tanc i ampolla)

En primer lloc, es va aspirar una mostra de 50 mL de gas per mitjà d'una xeringa (50 MR-VLLMA-GT, SGE, Ringwood, Austràlia), dessencant-lo prèviament amb una columna de perclorat magnèsic,  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ . Es van utilitzar xeringues especials per mostrejors de gasos, amb una gran estanquitat, tant a la zona de l'èmbol com al punt d'aspiració, que contenia una vàlvula de tancament. Cada mostra aspirada es va injectar a un contenidor hermètic individual (Vacutainer®, BD, Plymouth, UK) on va quedar emmagatzemada a  $4^\circ\text{C}$  fins l'anàlisi isotòpica. Els vacutainers són tubs d'extracció de sang que tenen fet el buit al seu interior. Es van fer servir vacutainers de vidre de 10



**Figura 3.8.1.** Injecció de les mostres de gas als vacutainers.

mL de volum (16 x 100mm), hermèticament tancats per un sèptum de goma d'1cm de gruix. Connectant una agulla a la xeringa es va injectar el gas al vacutainer fins omplir-lo (uns 10 mL, Fig. 3.8.1A). Tot seguit, es va punxar una segona agulla al vacutainer per tal d'injectar la resta del gas de la xeringa, i permetre així la ventilació del vacutainer amb el gas a analitzar. Les agulles es van punxar a diferents profunditats per afavorir una correcta renovació a l'interior del vacutainer (Fig. 3.8.1B). En finalitzar la injecció es van retirar ràpidament les dues agulles, començant per la segona, per evitar la contaminació amb l'aire exterior.

Per assegurar un mostreig correcte va ser necessària una gran estanquitat de tots els elements del circuit de gasos (tubs, connectors, vàlvules...). A més, durant la manipulació del gas també va resultar crític evitar la contaminació amb el CO<sub>2</sub> de la pròpia respiració, ja que la concentració de CO<sub>2</sub> de l'aire exhalat és d'unes 40.000 ppm, és a dir, unes 100 vegades superior a la de l'aire, a més d'una  $\delta^{13}\text{C}$  molt diferent ( $\approx -25\text{‰}$ ).

### 3. 8. 1. 2. ANÀLISI DE LA $\delta^{13}\text{C}$ DEL CO<sub>2</sub> PER GC/C/IRMS

La composició isotòpica del CO<sub>2</sub> de les mostres de gas emmagatzemades als vacutainers va ser determinada per cromatografia de gasos/combustió/espectrometria de masses de relació isotòpica (GC/C/IRMS, *Gas Chromatography/Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometry*) de flux continu (Fig. 3.8.2).

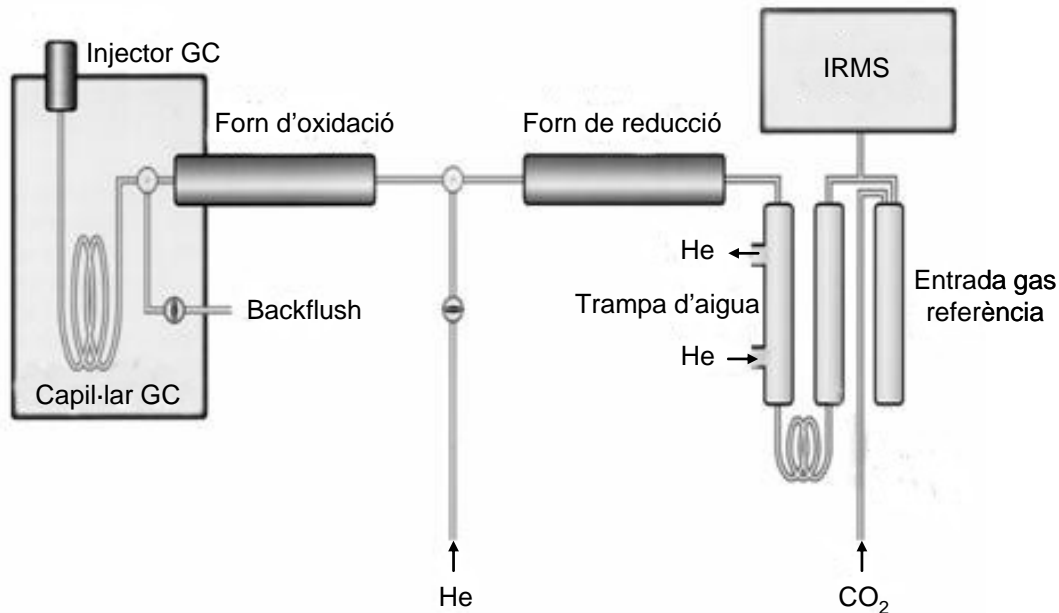
El CO<sub>2</sub> de les mostres es va purificar i separar amb un cromatògraf de gasos (6890N, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) acoblat a un espectròmetre de masses de relació isotòpica (Delta Plus, ThermoFinnigan, Bremen, Alemanya) a través d'una interfase de combustió (Combustion III, ThermoFinnigan, Bremen, Alemanya).

La columna de capil·laritat del cromatògraf va ser una GS-GASPRO (J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA) de 30 m de longitud x 0.32 mm i.d. Per mitjà d'una xeringa (Hamilton, Reno, NV, USA) es van aspirar de 0.5 mL dels vacutainers. Es van injectar manualment 0.3 mL de mostra a la columna, descartant els primers 0.2 mL. La injecció va ser en *split mode* amb un flux de 20 mL min<sup>-1</sup>. La temperatura de l'injector va ser de 220°C i la pressió de 7.8 bar.

El gas transportador va ser heli amb un flux de 1.4 mL min<sup>-1</sup>. Després de la separació cromatogràfica cada eluït va passar a través dels forns d'oxidació i reducció. El forn de combustió es va mantenir a 940°C i va consistir en un tub de ceràmica de 30 cm omplert amb 3 fils fins trenats (diàmetre 0.125 mm), un de níquel, un de coure i un de platí. Al forn de

reducció la temperatura de treball va ser de 600°C. En aquest cas, el tub de ceràmica estava omplert únicament amb fils de coure.

Després de passar per una trampa d'aigua, consistent en una membrana higroscòpica Nafion,



**Figura 3.8.2.** Esquema general de l'equip de GC/C/IRMS configurat per analitzar la  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  de gasos.

el corrent d'heli transporta el diòxid de carboni fins al IRMS per l'anàlisi de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ . A la font d'ionització les molècules de  $\text{CO}_2$  són ionitzades. Els ions generats són accelerats a través del tub de vol i deflectats per un camp magnètic. Posteriorment són recollits per 3 col·lectors diferents (copes de Faraday) ubicats a la trajectòria del radi de vol de cada isòtop segons el seu pes molecular 44, 45 o 46. L'amplitud dels pics obtinguts a nivell de l'IRMS va oscil·lar entre 200 i 300 mV. La composició isotòpica del carboni es va expressar com la desviació relativa en comparació a l'estàndard internacional (*Pee Dee Belemnite*):

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left( \frac{R_{\text{mostra}} - R_{\text{estàndard}}}{R_{\text{estàndard}}} \right) \cdot 1000 \quad \text{on} \quad R = \frac{^{13}\text{CO}_2}{^{12}\text{CO}_2}$$

El sistema va ser controlat pel programa Isodat NT (ThermoFinnigan, Bremen, Alemanya), que també va gestionar l'adquisició de les dades i el càlcul dels valors de  $\delta^{13}\text{C}$  respecte a un gas de referència. Abans de la mostra es van injectar dos pics de referència al IRMS i un tercer després de la mostra. El temps total d'anàlisi de cada mostra va ser d'uns 600 s.

### 3. 8. 2. COMPOSICIÓ ISOTÒPICA I ANÀLISI ELEMENTAL DE LA MATÈRIA ORGÀNICA DELS TEIXITS VEGETALS

A diferents moments del marcatge isotòpic de llarga durada (a l'inici, als 5 mesos i als 20 mesos) es va analitzar la matèria orgànica dels diferents òrgans (fulles, tiges i arrels) de plantes sotmeses i no sotmeses al marcatge. Al llarg del marcatge de curta durada es va fer un seguiment únicament de les fulles.

A les diferents mostres es va determinar el contingut de carboni (%), nitrogen (%) i la relació C/N per anàlisi elemental (EA), així com la  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) i  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) per espectrometria de masses de relació isotòpica (IRMS).

Es va partir de material sec, liofilitzat o assecat a 60°C, que es va moldre fins a l'obtenció d'una pols fina. A l'interior d'una càpsula d'estany, es va pesar una submostra representativa de matèria seca (entre 1 i 2 mg) i es va segellar fent un paquet. Les mostres es van introduir automàticament al sistema d'anàlisi per mitjà d'un carro giratori.

L'equip de mesura va consistir en un analitzador elemental Flash 1112 (Carlo Erba Instrumentazione, Milà, Itàlia) acoblat a un espectròmetre de masses de relació isotòpica de flux continu (Delta C, ThermoFinnigan, Bremen, Alemanya), a un pirolitzador TC-EA i a un *breath bench*, mitjançant una interfície Conflo II (ThermoFinnigan, Bremen, Alemanya).

Després de sotmetre les mostres a combustió i posterior reducció, es van analitzar el  $\text{N}_2$  i el  $\text{CO}_2$  purs generats per determinar els continguts de N i C, així com les composicions isotòpiques. Els valors obtinguts es van corregir utilitzant els següents estàndards:

- Atropina (Carlo Erba, Milà, Itàlia), per anàlisi elemental
- Patrons de nitrogen (IAEA, Viena, Àustria)
  - IAEA N1 i IAEA N2 ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )
  - IAEA NO3 ( $\text{KNO}_3$ )
- Patrons de carboni (IAEA, Viena, Àustria)
  - IAEA CH3 (cel·lulosa)
  - IAEA CH6 (sacarosa)
  - IAEA CH7 (polietilè)

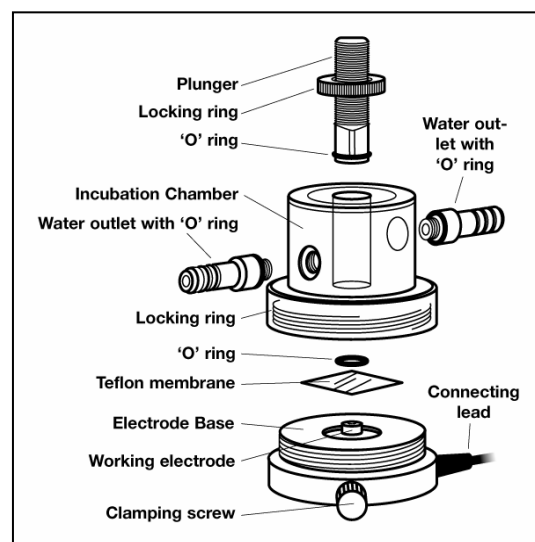
### 3. 9. DETERMINACIÓ DE LA TAXA DE RESPIRACIÓ FOLIAR

La taxa de respiració foliar a la foscor es va obtenir a partir de dues tècniques: mesurant el consum d'O<sub>2</sub> amb l'elèctrode de Clark i la producció de CO<sub>2</sub> mitjançant un IRGA.

#### 3. 9. 1. DETERMINACIÓ DE LA TAXA DE RESPIRACIÓ PER CONSUM D'O<sub>2</sub>

Les taxes de respiració a la foscor del teixit foliar es van determinar amb l'elèctrode d'oxigen polarogràfic tipus Clark de fase líquida (Clark 1956) (Model Linseis L6512; Rank Brothers, Cambridge, UK). Les mesures es van fer en 6 individus diferents de cada espècie i tractament. Es van seleccionar fulles joves però totalment desenvolupades i es van obtenir fragments. Els talls de teixit es van infiltrar fent el buit en un matràs Kita-sato que contenia tampó MES (Àcid 2-N-[Morfolino]etanolsulfònic) 30 mM amb CaCl<sub>2</sub> 0.2 mM a pH 6.2. Posteriorment, es van incubar les mostres durant 20 minuts sota les mateixes condicions en què es van realitzar les mesures, és a dir, submergides en tampó MES, a les fosques i a 25°C. Per disminuir la variabilitat associada al cicle diari, totes les mesures de respiració es van realitzar dins la mateixa franja horària, entre 3 i 6 hores després del començament del cicle de foscor (de 1:00 a 4:00h AM), període en què la taxa de respiració en aquestes espècies és estable.

L'elèctrode d'oxigen actua com una cèl·lula electroquímica on es genera un corrent elèctric que és proporcional a la concentració d'O<sub>2</sub> que es troba present a la solució tamponada. El tampó està en contacte amb l'elèctrode, però separat per una membrana de tefló, material permeable a l'O<sub>2</sub> i impermeable a altres gasos. L'elèctrode d'oxigen consisteix en dos anells connectats a través d'una solució electrolítica (KCl), un de platí (càtode) i un altre de plata (ànode) situats en una base de plàstic (Fig. 3.9.1). La cambra, on es col·loca el tampó i la mostra vegetal, se



**Figura 3.9.1.** Elèctrode d'O<sub>2</sub> de fase líquida i cambra de mesura termostatitzada.



situa sobre l'elèctrode. Envoltant la cambra hi ha una camisa d'aigua que connecta amb un bany d'aigua termostatitzat, la qual cosa permet controlar-hi la temperatura durant les mesures. La solució es manté en agitació contínua mitjançant un agitador magnètic, mentre que l'interior de la cambra queda aïllat de l'exterior gràcies a un tap. Quan s'aplica als elèctrodes un voltatge polaritzador de 0.7 V, es genera un corrent elèctric entre l'ànode (plata) i el càtode (platí), la intensitat del qual és directament proporcional a la concentració d'O<sub>2</sub> dissolt al tampó. Mitjançant un enregistrator es realitza una lectura en continu de la concentració d'oxigen de la solució.

El calibratge de l'elèctrode s'efectua sense mostra i consta de dos punts (0 i 100% d'O<sub>2</sub> dissolt). L'ajust del 0 es realitza afegint una petita quantitat d'hidrosulfit de sodi (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), un potent agent reductor que segresta l'oxigen dissolt a la solució. El 100% d'O<sub>2</sub> correspon a la lectura que dona l'elèctrode després que el tampó arribi a l'equilibri amb l'aire, en aquest cas 253 μmol O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, ja que les mesures es van realitzar a 25°C.

En cada cas, es va calcular la taxa de respiració partir del pendent enregistrat, el volum i la temperatura del tampó, així com la quantitat de material vegetal introduït a la cambra.

Inicialment, les taxes de respiració es van obtenir en relació al pes sec de mostra vegetal (μmol O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>), determinant el pes sec de les mostres amb una balança de precisió de 0.1 mg, després d'assecar-les a una estufa a 60°C fins a pes constant. Les taxes de respiració per àrea foliar (μmol O<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) es van calcular a partir del pes específic foliar (SLW) de cada fulla.

### *3. 9. 2. DETERMINACIÓ DE LA TAXA DE RESPIRACIÓ PER EMISSIÓ DE CO<sub>2</sub>*

La producció de CO<sub>2</sub> a la foscor es va avaluar mitjançant el sistema obert de mesura de bescanvi de gasos Li-6400 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA), descrit a l'apartat 3. 5. 1, sobre les mateixes fulles i sota les mateixes condicions de temperatura i moment del dia que les mesures de respiració realitzades amb l'elèctrode d'O<sub>2</sub>. Els resultats també s'han expressat per unitat d'àrea (μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) i de pes sec (μmol CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>).

### 3. 9. 3. DETERMINACIÓ DEL SUBSTRAT RESPIRATORI PER ANÀLISI DE RQ

El quocient respiratori (RQ) és la relació entre la quantitat de CO<sub>2</sub> produït [ $v(\text{CO}_2)$ ] i la quantitat d'O<sub>2</sub> consumit [ $v(\text{O}_2)$ ] per un teixit o òrgan. A partir de les mesures descrites als apartats anteriors de producció de CO<sub>2</sub> i consum d'O<sub>2</sub> es va obtenir el quocient respiratori ( $\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol O}_2^{-1}$ ) en sis individus de cada espècie i tractament.

$$RQ = \frac{v(\text{CO}_2)}{v(\text{O}_2)}$$

L'origen del substrat respiratori pot ser determinat mitjançant el quocient respiratori (RQ). Aquesta relació és propera a 1 quan es respiren glúcids, i inferior a 1 quan els substrats menys oxigenats són consumits per la respiració. Així, valors de RQ al voltant 0.6 indiquen que majoritàriament es produeix un consum de lípids a la respiració, mentre que 0.8 correspondria a proteïnes. També es donen relacions superiors a 1, ja que amb la utilització d'àcids orgànics com a substrat respiratori s'obté un RQ d'aproximadament 1.2.

### 3. 10. DETERMINACIÓ DE LA DENSITAT ESTOMÀTICA

La densitat estomàtica es va determinar en 6 individus diferents de cada espècie i tractament. Es va aplicar una capa fina de laca d'ungles sobre les fulles evitant el nervi central. Es va deixar assecar la laca i a continuació es va arrencar mitjançant l'aplicació de cinta adhesiva (Teare *et al.* 1971). Es va muntar la cinta al portaobjectes i es va observar la preparació al microscopi òptic (Olympus CH, Tokio, Japó) amb l'objectiu de 40 augmentos, comptant el nombre d'estomes de 6 camps visuals de diferents zones de la preparació ( $\phi$  camp=0,45 mm, S=0,159 mm<sup>2</sup>). Es va calcular la densitat estomàtica com a nombre d'estomes per mm<sup>2</sup> de superfície foliar. A *Chamaerops* es va determinar a les dues cares de la fulla, anvers (cara adaxial) i revers (cara abaxial), ja que es tracta d'una espècie amfistomàtica. En canvi, a *Cycas*, amb fulles hipostomàtiques, només es va fer el comptatge d'estomes a la cara abaxial.

### **3. 11. MICROSCÒPIA**

La microscòpia òptica va permetre realitzar una caracterització a nivell histològic de les fulles de les espècies estudiades.

Amb el micròtom de Ranvier es van obtenir talls fins de les fulles, que es van muntar al portaobjectes. Sense cap tinció es van observar els diferents teixits i estructures amb el microscopi òptic (Leica DM-2500, Wetzlar, Alemanya).

### **3. 12. DISSENY I TRACTAMENT ESTADÍSTIC DE LES DADES**

En ambdues espècies, el disseny experimental fonamental està format per un únic factor, la concentració de CO<sub>2</sub> de creixement, que consta de dos nivells, CO<sub>2</sub> ambiental (A) i CO<sub>2</sub> elevat (E).

L'anàlisi estadística d'aquestes dades es va realitzar segons el procediment ANOVA d'un factor del paquet estadístic SPSS (versió 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). En cas de diferències significatives entre tractaments, s'han utilitzat símbols o lletres per representar-ho a les figures i taules.

Al capítol 4. 2. el disseny està format per dos o tres factors segons l'experiment. En aquest cas es va realitzar una anàlisi de la variància multifactorial amb el SPSS per determinar l'efecte de cada factor. En cas de diferències significatives, la separació de mitjanes es va realitzar mitjançant el test de Duncan de comparació múltiple.



## **4. RESULTATS**

---



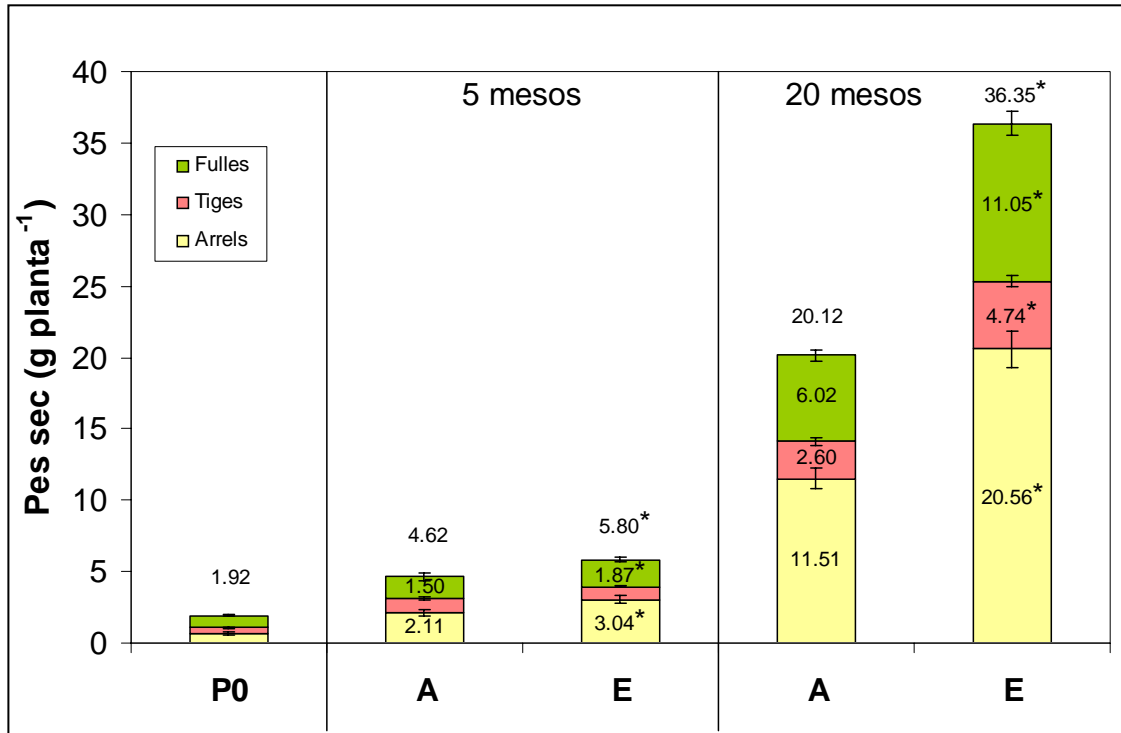
## 4. RESULTATS

### 4. 1. EFECTES DEL CO<sub>2</sub> ELEVAT SOBRE LA PRODUCCIÓ DE BIOMASSA

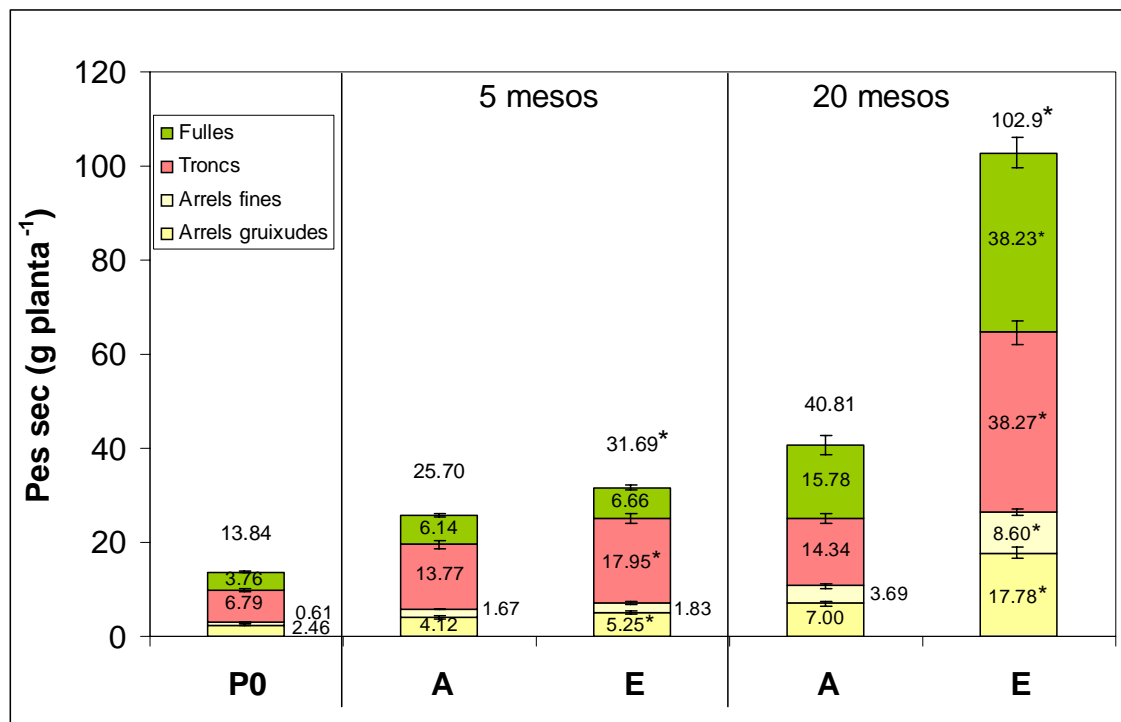
#### 4. 1. 1. MESURES DESTRUCTIVES

L'anàlisi de la producció de biomassa a *Chamaerops humilis* obtinguts a l'inici, als 5 i als 20 mesos d'exposició a CO<sub>2</sub> elevat es mostra a la figura 4.1.1. De manera general, es pot observar, en resposta al CO<sub>2</sub> elevat, un estímul del creixement, que va augmentar amb el temps. Als 5 mesos d'aplicació del tractament, les plantes de *Chamaerops humilis* sotmeses a CO<sub>2</sub> elevat (E) ja presentaven una biomassa significativament superior a la de les plantes crescudes a CO<sub>2</sub> ambiental (A), donant-se un increment del pes sec per planta del 25%. Desglossant per fraccions, es pot observar com les diferències significatives es van produir únicament en la biomassa de fulles i arrels. Aquesta darrera fracció va tenir l'augment de biomassa més important (Fig. 4.1.1). Després de 20 mesos de creixement sota CO<sub>2</sub> elevat, la biomassa de les plantes E va arribar a ser un 81% superior a la biomassa de les plantes A. En aquest punt de mostreig, es van donar diferències significatives de pes sec a totes les fraccions analitzades, fulles, tiges i arrels.

A *Cycas revoluta*, la producció de biomassa també va respondre al CO<sub>2</sub> elevat de manera positiva i ascendent en el temps (Fig. 4.1.2). Als 5 mesos, el pes sec per planta va ser aproximadament un 23% superior a les plantes crescudes a CO<sub>2</sub> elevat en relació a les plantes de CO<sub>2</sub> ambiental. Per fraccions, en aquest punt només hi va haver diferències significatives a la biomassa del tronc i de les arrels gruixudes (Fig. 4.1.2). Al final de l'experiment, hi va haver diferències significatives entre tractaments al pes sec de totes les fraccions analitzades. Així, als 20 mesos, l'increment de biomassa total que va produir el CO<sub>2</sub> elevat va ser del 152%.



**Figura 4.1.1.** Producció de biomassa total i per fraccions a *Chamaerops humilis* a llarg de l'experiment (n=10). Els asteriscos indiquen diferències significatives entre tractaments de CO<sub>2</sub> (p<0.05). A: plantes crescudes a CO<sub>2</sub> ambiental; E: plantes crescudes a CO<sub>2</sub> elevat.



**Figura 4.1.2.** Producció de biomassa total i per fraccions a *Cycas revoluta* a l'inici, als 5 mesos i al final de l'experiment (n=10).



**Taula 4.1.1.** Paràmetres complementaris de l'anàlisi destructiva del creixement a *Chamaerops humilis* a l'inici de l'experiment, als 5 i als 20 mesos d'aplicació de CO<sub>2</sub> (n=10). Els asteriscos indiquen diferències significatives entre tractaments (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001).

Paràmetres	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>		P <sub>F</sub>	
	punt inicial	5 mesos		20 mesos	
		A	E	A	E
<b>Alçada (cm)</b>	27.0 ± 0.6	27.3 ± 1.5	30.3 ± 1.5	27.4 ± 1.0	30.8 ± 1.7 *
<b>φ tija (mm)</b>	4.4 ± 0.2	5.9 ± 0.3	7.2 ± 0.4 *	17.2 ± 1.1	23.0 ± 1.0 ***
<b>Nº fulles</b>	2.8 ± 0.1	4.1 ± 0.2	4.1 ± 0.2	11.0 ± 0.6	12.0 ± 0.3
<b>Àrea foliar (cm<sup>2</sup>)</b>	46.4 ± 3.3	73.7 ± 7.3	78.3 ± 7.5	228.6 ± 14.3	374.0 ± 34.5 ***
<b>LAI (m<sup>2</sup> m<sup>-2</sup>)</b>	0.12 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.57 ± 0.04	0.93 ± 0.09 ***
<b>SLW (g m<sup>-2</sup>)</b>	183.3 ± 4.8	198.1 ± 13.5	241.7 ± 9.4 *	269.5 ± 9.6	312.7 ± 9.6 *
<b>LWR (g g<sup>-1</sup>)</b>	0.44 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01
<b>SWR (g g<sup>-1</sup>)</b>	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.16 ± 0.01 *	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01
<b>RWR (g g<sup>-1</sup>)</b>	0.34 ± 0.01	0.46 ± 0.02	0.52 ± 0.01 *	0.57 ± 0.01	0.57 ± 0.01
<b>Root / Shoot (g g<sup>-1</sup>)</b>	0.53 ± 0.03	0.89 ± 0.08	1.09 ± 0.06 *	1.34 ± 0.05	1.31 ± 0.05

A més de les mesures de pes sec, l'efecte del CO<sub>2</sub> elevat sobre el creixement de *Chamaerops humilis* també es va estudiar a partir d'altres paràmetres. El diàmetre de la tija va augmentar significativament, tant als 5 mesos com als 20 mesos de tractament, per efecte del CO<sub>2</sub> elevat (Taula 4.1.1). L'alçada de la planta pràcticament no va augmentar al llarg de l'experiment, sobretot al tractament de CO<sub>2</sub> ambiental. Als 5 mesos de tractament no es va veure afectada pel CO<sub>2</sub> elevat, però als 20 mesos de cultiu va ser superior a les plantes E (Taula 4.1.1). En cap cas el nombre de fulles va mostrar diferències significatives entre tractaments. L'àrea foliar i l'índex d'àrea foliar (LAI) van augmentar per efecte del CO<sub>2</sub> als 20 mesos, però no als 5. El pes específic foliar (SLW), lleugerament superior en plantes E als 5 i als 20 mesos, va presentar valors molt elevats i va incrementar notablement al llarg del cultiu (Taula 4.1.1). Als 5 mesos de tractament la partició de biomassa va presentar diferències. Així, el CO<sub>2</sub> elevat va augmentar el Root/Shoot i la relació de pes d'arrels (RWR), mentre que va disminuir la relació de pes de tiges (SWR). En canvi, la relació de pes de fulles (LWR) i tots els índex obtinguts als 20 mesos no van donar diferències significatives entre tractaments (Taula 4.1.1).

**Taula 4.1.2.** Paràmetres complementaris de l'anàlisi destructiva del creixement a *Cycas revoluta* a l'inici de l'experiment, als 5 i als 20 mesos d'aplicació de CO<sub>2</sub> (n=10). Els asteriscos indiquen diferències significatives entre tractaments (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001).

Paràmetres	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>		P <sub>F</sub>	
	punt inicial	5 mesos		20 mesos	
		A	E	A	E
<b>Alçada (cm)</b>	20.8 ± 0.5	21.7 ± 0.5	20.9 ± 0.7	21.8 ± 1.4	29.6 ± 1.8 **
<b>φ tija (mm)</b>	31.6 ± 0.7	39.0 ± 0.5	41.4 ± 1.0 *	44.3 ± 1.3	68.7 ± 1.2 ***
<b>Nº fulles</b>	3.7 ± 0.3	6.2 ± 0.3	5.9 ± 0.2	16.2 ± 1.4	17.8 ± 0.9
<b>Àrea foliar (cm<sup>2</sup>)</b>	202 ± 9.8	333 ± 16	333 ± 24	523 ± 77	1201 ± 111 ***
<b>LAI (m<sup>2</sup> m<sup>-2</sup>)</b>	0.40 ± 0.02	0.67 ± 0.03	0.67 ± 0.05	1.05 ± 0.15	2.40 ± 0.22 ***
<b>SLW (g m<sup>-2</sup>)</b>	187 ± 2.6	184 ± 4.4	200 ± 4.0 *	299 ± 7.0	333 ± 10.2 *
<b>LWR (g g<sup>-1</sup>)</b>	0.27 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.37 ± 0.03	0.37 ± 0.02
<b>SWR (g g<sup>-1</sup>)</b>	0.49 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.57 ± 0.01	0.36 ± 0.03	0.37 ± 0.02
<b>RWR (g g<sup>-1</sup>)</b>	0.24 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01
<b>Root / Shoot (g g<sup>-1</sup>)</b>	0.32 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.35 ± 0.02

A *Cycas revoluta*, el CO<sub>2</sub> elevat va augmentar significativament el diàmetre de la tija, tant als 5 mesos com als 20 mesos de tractament (Taula 4.1.2). L'alçada de la planta no va presentar diferències al 5 mesos, però als 20 les plantes crescudes a alt CO<sub>2</sub> van presentar una major alçada. El nombre de fulles no va mostrar en cap cas diferències significatives entre tractaments. Als 5 mesos, es va estudiar amb més profunditat la fracció de fulles, separant les fulles presents a la planta des de l'inici de l'experiment de les fulles de nova formació. Durant aquest període, l'àrea foliar, el pes sec i el SLW de les fulles velles dels dos tractaments no va variar pràcticament en relació al punt inicial (Taula 4.1.3). Pel que fa a les fulles noves, només es va donar efecte del CO<sub>2</sub> al SLW, que va ser superior a les plantes E. Així, el CO<sub>2</sub> elevat només va incrementar el SLW del total de fulles, però no va alterar-ne significativament ni el pes ni l'àrea (Taula 4.1.3). Al P<sub>F</sub> de mostreig, el CO<sub>2</sub> elevat va produir un increment de l'àrea foliar, el LAI i el SLW (Taula 4.1.2). A diferència de *Chamaerops*, *Cycas revoluta* no va presentar alteracions dels índex d'al·locació de biomassa (LWR, SWR, RWR i Root/ Shoot) en resposta al CO<sub>2</sub> (Taula 4.1.2).

**Taula 4.1.3.** Formació de fulles a *Cycas revoluta* durant els primers 5 mesos d'aplicació de CO<sub>2</sub> (n=10). Els asteriscos indiquen diferències significatives entre tractaments (\* p<0.05).

Paràmetre	Fracció	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	
		punt inicial	5 mesos	
			A	E
Àrea foliar (cm <sup>2</sup> )	Fulles velles	201.9 ± 9.8	197.8 ± 11.6	212.8 ± 9.1
	Fulles noves	nd	135.2 ± 14.8	119.8 ± 17.9
	Total fulles	201.9 ± 9.8	333.0 ± 15.8	332.7 ± 24.0
PS fulles (g)	Fulles velles	3.76 ± 0.16	3.82 ± 0.25	4.18 ± 0.20
	Fulles noves	nd	2.33 ± 0.37	2.48 ± 0.41
	Total fulles	3.76 ± 0.16	6.14 ± 0.35	6.66 ± 0.53
SLW (g m <sup>-2</sup> )	Fulles velles	186.9 ± 2.6	192.6 ± 4.1	196.0 ± 2.6
	Fulles noves	nd	165.0 ± 11.5	210.6 ± 11.2 *
	Total fulles	186.9 ± 2.6	184.1 ± 4.4	199.7 ± 4.0 *

**Taula 4.1.4.** Taxa de creixement relatiu (RGR) de diversos paràmetres de creixement a *Chamaerops humilis* durant el període inicial de cultiu (0-5 mesos), el final (5-20 mesos) i el total (0-20 mesos).

RGR	Inicial		Final		Total	
	A	E	A	E	A	E
Alçada (cm cm <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	0.00008	0.00078	0.00003	0.00001	0.00001	0.00019
φ tija (mm mm <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	0.00197	0.00328	0.00228	0.00250	0.00221	0.00268
Nº fulles	0.00259	0.00259	0.00210	0.00229	0.00222	0.00236
Àrea foliar (cm <sup>2</sup> cm <sup>-2</sup> dia <sup>-1</sup> )	0.00315	0.00357	0.00241	0.00333	0.00258	0.00338
PS fulles (g g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	0.00388	0.00538	0.00296	0.00379	0.00317	0.00416
PS tiges (g g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	0.00617	0.00526	0.00201	0.00358	0.00299	0.00398
PS arrels (g g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	0.00785	0.01033	0.00361	0.00407	0.00461	0.00555
PS planta (g g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	0.00597	0.00751	0.00313	0.00391	0.00380	0.00476

La taxa de creixement relatiu (RGR) obtinguda a *Chamaerops humilis* pels diferents paràmetres de creixement va presentar valors molt baixos (Taula 4.1.4). De manera general l'elevat CO<sub>2</sub> va produir un increment de RGR a pràcticament tots els paràmetres estudiats, a excepció del nombre de fulles i el pes sec de tiges al període inicial, així com l'alçada al període final (Taula 4.1.4). L'augment de la taxa de creixement relatiu en resposta a l'alt CO<sub>2</sub> va ser més important durant el període inicial que al període final. També es pot observar una disminució en el temps del RGR, és a dir, el RGR de tots els paràmetres dintre dels 5 primers mesos d'assaig va ser major que els RGR del període final. Aquesta reducció a la taxa de creixement relatiu va ser més important al tractament E (Taula 4.1.4). Tot i això, el RGR del

tractament elevat es va mantenir per sobre del de les plantes crescudes a CO<sub>2</sub> ambiental. Per òrgans, les arrels van ser fracció amb el RGR més elevat.

**Taula 4.1.5.** Taxa de creixement relatiu (RGR) de diversos paràmetres de creixement a *Cycas revoluta* durant el període inicial de cultiu (0-5 mesos), el final (5-20 mesos) i el total (0-20 mesos).

RGR	Inicial		Final		Total	
	A	E	A	E	A	E
Alçada (cm cm <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	0.00028	0.00002	0.00001	0.00074	0.00008	0.00057
φ tija (mm mm <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	0.00143	0.00184	0.00027	0.00108	0.00055	0.00126
Nº fulles	0.00345	0.00311	0.00205	0.00235	0.00238	0.00253
Àrea foliar (cm <sup>2</sup> cm <sup>-2</sup> dia <sup>-1</sup> )	0.00340	0.00340	0.00096	0.00274	0.00154	0.00289
PS fulles (g g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	0.00335	0.00390	0.00201	0.00373	0.00232	0.00376
PS tiges (g g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	0.00481	0.00661	0.00009	0.00161	0.00121	0.00280
PS PA (g g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	0.00433	0.00577	0.00088	0.00242	0.00170	0.00321
PS arrels gruix (g g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	0.00351	0.00516	0.00113	0.00260	0.00169	0.00320
PS arrels fines (g g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	0.00469	0.00532	0.00169	0.00330	0.00240	0.00377
PS arrels (g g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	0.00383	0.00520	0.00131	0.00280	0.00190	0.00337
PS planta (g g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	0.00421	0.00563	0.00099	0.00251	0.00175	0.00325

A *Cycas revoluta* la taxa de creixement relatiu (RGR) va ser encara més baixa que a *Chamaerops humilis* (Taula 4.1.5). El CO<sub>2</sub> elevat va produir un increment de RGR a la majoria de paràmetres estudiats durant el primer inicial i a la totalitat durant el final, a excepció del nombre de fulles (Taula 4.1.5). L'efecte del CO<sub>2</sub> sobre el RGR va ser molt més important durant el període final de cultiu, incrementant el RGR del pes sec de la planta un 153% en relació a les plantes A. Així, mentre que aquestes plantes van mostrar una forta disminució del RGR comparant l'inicial amb el final, la reducció a les plantes E va ser bastant més moderada. Durant el primer període, la fracció amb un RGR més alt va ser el tronc, mentre que al període final van ser les fulles. Resulta interessant observar com les plantes crescudes a CO<sub>2</sub> elevat van aconseguir mantenir constant en el temps el RGR de les fulles (Taula 4.1.5).

#### 4. 1. 2. RELACIÓ ENTRE MESURES DESTRUCTIVES I NO DESTRUCTIVES

Paral·lelament a les mesures destructives es van realitzar, sobre els mateixos individus, mesures no destructives d'alçada de la planta, nombre de fulles i diàmetre de la tija o del tronc. En ambdues espècies, el paràmetre no destructiu que millor va correlacionar amb la biomassa total de l'individu va ser el diàmetre de la tija (*Chamaerops*) o del tronc (*Cycas*) (Figs. 4.1.3 i 4.1.4). No es mostren les correlacions obtingudes amb la resta de paràmetres no destructius (alçada i nombre de fulles). Tant en el cas de *Chamaerops* com en el de *Cycas*, les correlacions són altament significatives ( $p < 0.0001$ ). Per això, es van utilitzar directament per realitzar estimacions de la biomassa de l'individu, és a dir, no es va considerar necessari generar un model més complex basat en més d'una variable. Les corbes de creixement exponencial van ser les funcions que millor ajust van proporcionar. Les equacions resultants es detallen a continuació:

- *Chamaerops humilis* (Fig. 4.1.3)

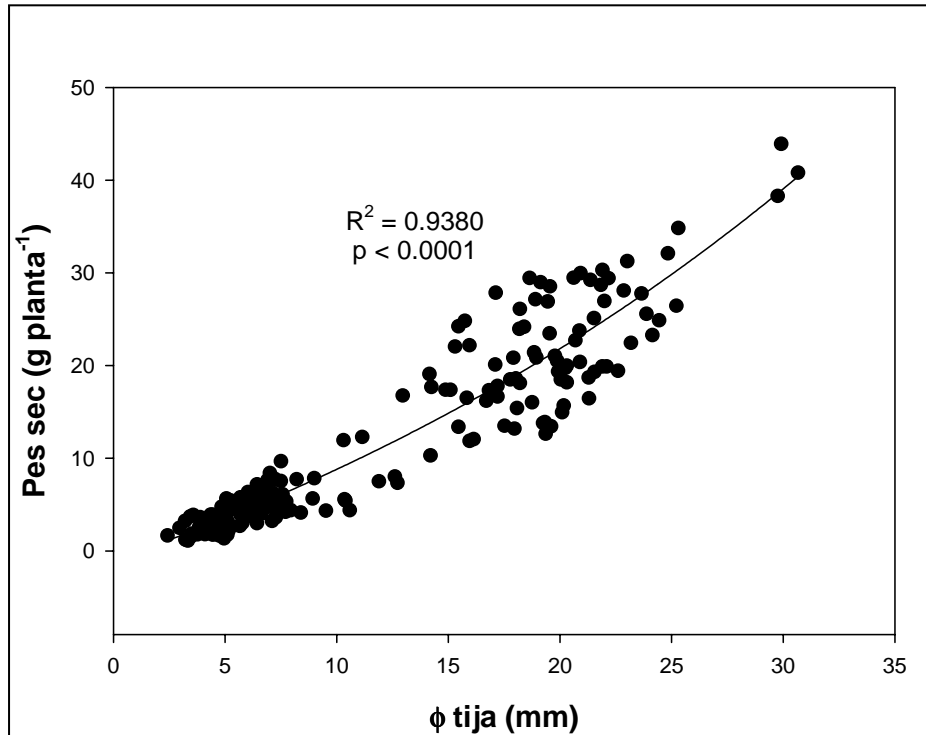
$$\text{Pes sec (g)} = -31.2 + 30.2 \cdot 1.03^{\phi}$$

on  $\phi$  és el diàmetre de la tija en mm.

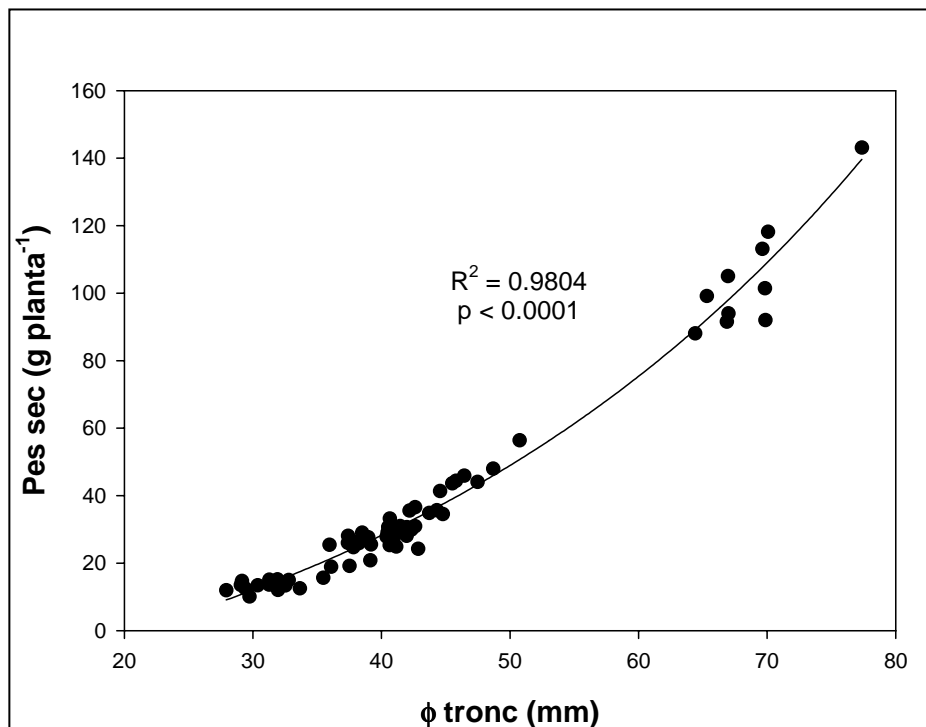
- *Cycas revoluta* (Fig. 4.1.4)

$$\text{Pes sec (g)} = -46.9 + 28.4 \cdot 1.02^{\phi}$$

on  $\phi$  és el diàmetre del tronc en mm.



**Figura 4.1.3.** Correlació entre el diàmetre de la tija i el pes sec de la planta a *Chamaerops humilis* (n=195).

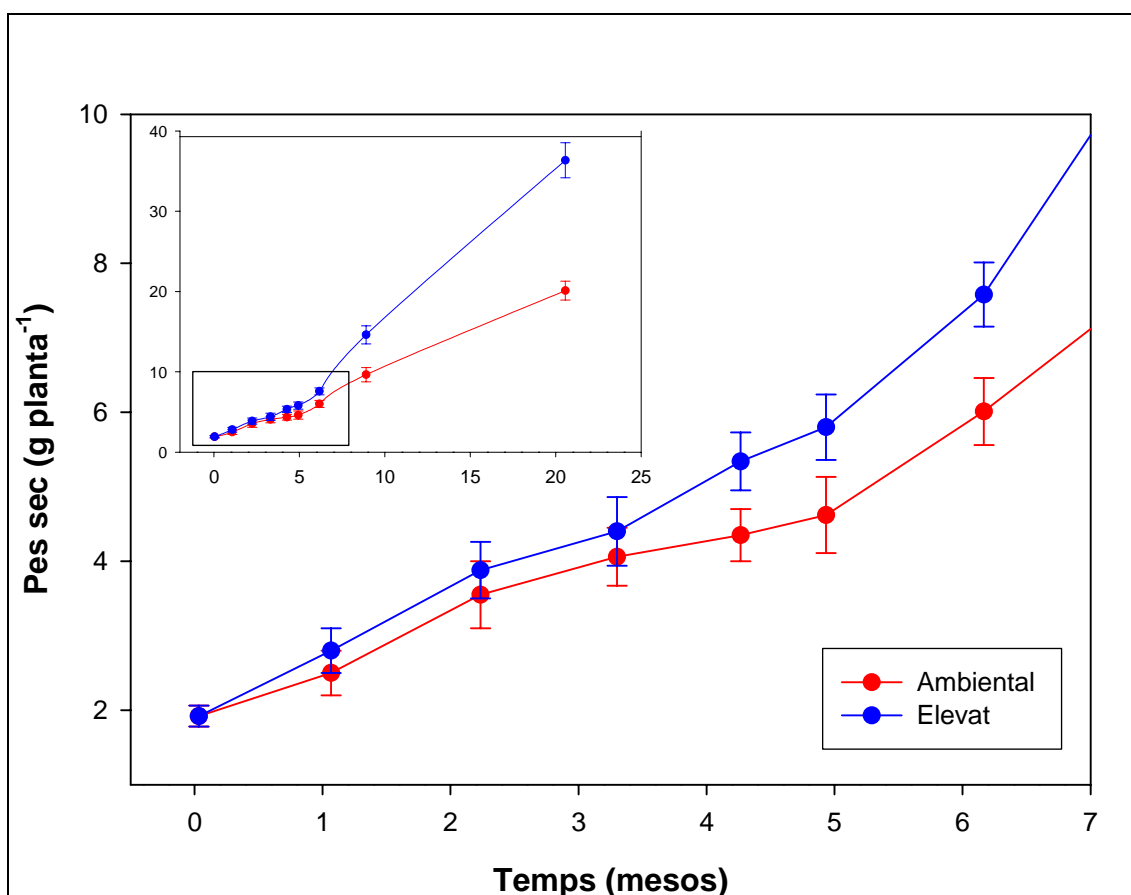


**Figura 4.1.4.** Correlació entre el diàmetre del tronc i el pes sec de la planta a *Cycas revoluta* (n=65).

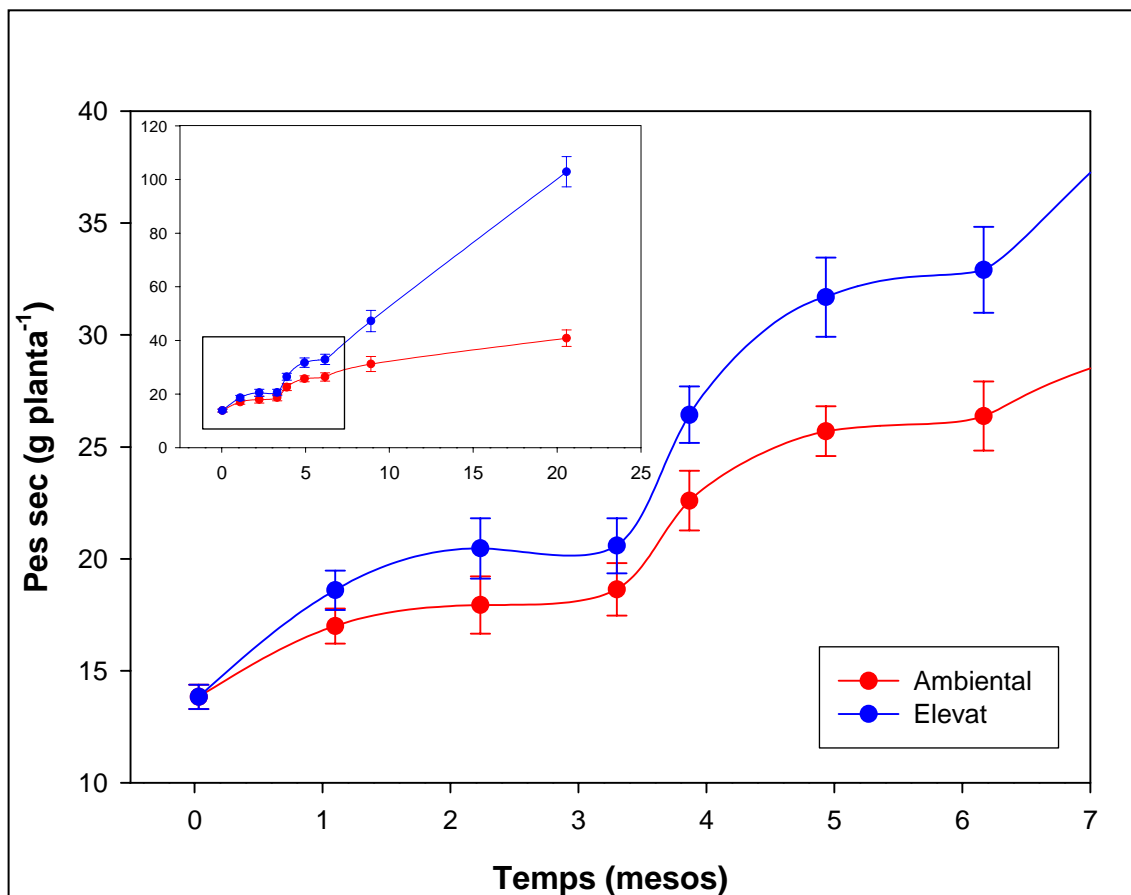
#### 4. 1. 3. ANÀLISI DE LA CINÈTICA DE CREIXEMENT

L'evolució del creixement es va analitzar mitjançant l'estimació no destructiva del pes sec dels 10 individus de cada espècie i tractament de CO<sub>2</sub>, seleccionats a l'atzar a l'inici de l'assaig, a partir de mesures del diàmetre de la tija o el tronc.

La cinètica de creixement de *Chamaerops humilis* va ser homogènia al llarg de tot l'experiment, observant-se en ambdós tractaments un increment de pes sec bastant lineal en el temps (Fig. 4.1.5). Des de l'inici de l'exposició a CO<sub>2</sub> elevat, l'increment de CO<sub>2</sub> atmosfèric va estimular de manera creixent la producció de biomassa. D'aquesta manera, es van començar a donar diferències significatives entre tractaments a partir del cinquè punt de mesura, és a dir, al voltant dels 4 mesos de cultiu. Al final de l'experiment, les diferències entre tractaments van augmentar considerablement (Fig. 4.1.5, gràfic inserit).



**Figura 4.1.5.** Seguiment del creixement a *Chamaerops humilis* durant els primers 6 mesos d'exposició a CO<sub>2</sub> elevat (n=10). El gràfic inserit a la part superior esquerra representa el seguiment del creixement corresponent al període total de cultiu, 20 mesos.

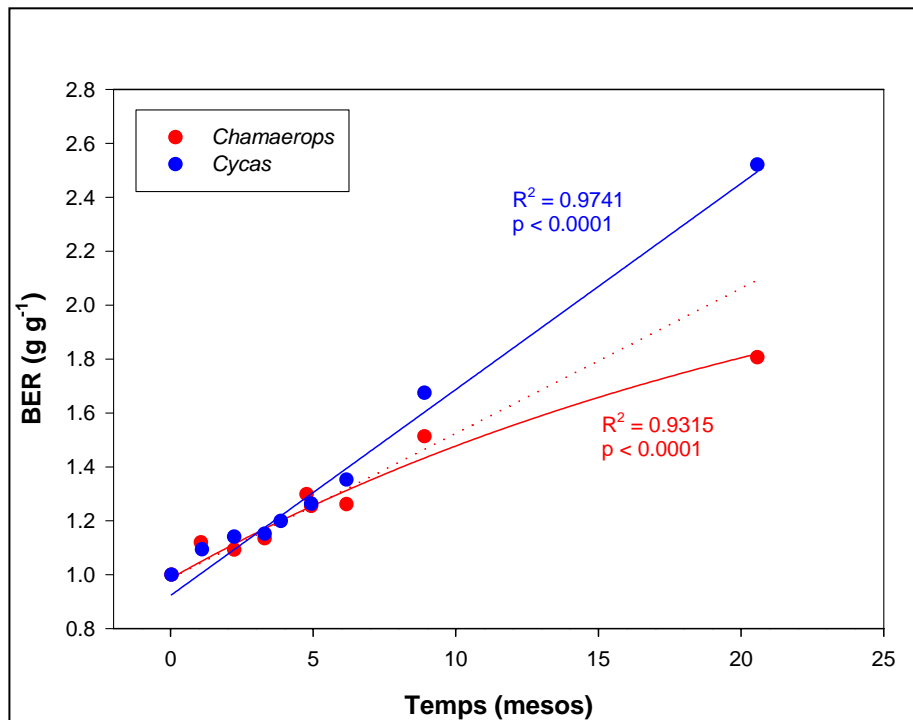


**Figura 4.1.6.** Seguiment del creixement a *Cycas revoluta* durant els primers 6 mesos d'exposició a CO<sub>2</sub> elevat (n=10). El gràfic inserit a la part superior esquerra representa el seguiment del creixement corresponent al període total de cultiu, 20 mesos.

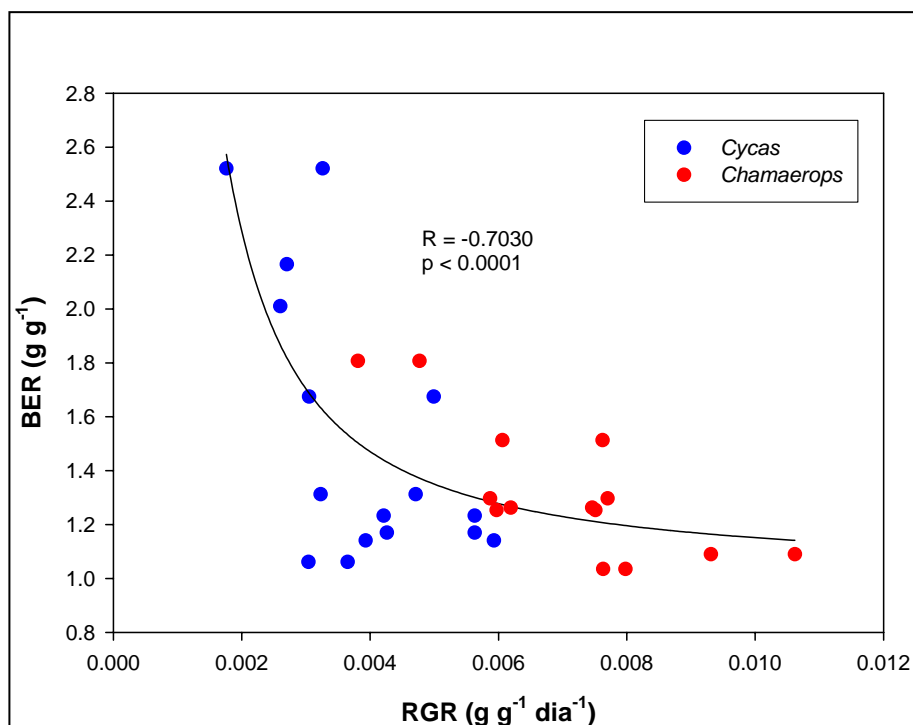
A *Cycas revoluta*, l'evolució del creixement no va ser lineal, més aviat es va donar una cinètica discontinua. La formació de matèria seca de les plantes de tots dos tractaments va alternar etapes de creixement lent amb etapes de creixement molt lent. Dins dels primers 6 mesos, es van observar dos períodes d'arrencada i aturada del creixement (Fig. 4.1.6). El CO<sub>2</sub> elevat va estimular progressivament el creixement, amb un efecte significatiu a partir del quart mes d'exposició. Durant tot el període, les diferències entre tractaments van anar augmentant amb el temps, fins arribar a ser molt importants al final del cultiu (Fig. 4.1.6, gràfic inserit).

A cada punt del seguiment del creixement, dividint la biomassa de les plantes crescudes a CO<sub>2</sub> elevat entre la biomassa a CO<sub>2</sub> ambiental, es va obtenir l'estímul del CO<sub>2</sub> elevat sobre la producció de biomassa (BER, *Biomass Enhancement Ratio*). A *Cycas revoluta* el BER va augmentar amb el temps, seguint una evolució lineal fins al final de l'experiment (Fig. 4.1.7).





**Figura 4.1.7.** Comparativa entre espècies de l'evolució temporal de l'estímul del CO<sub>2</sub> elevat sobre la producció de biomassa (BER).



**Figura 4.1.8.** Relació entre la proporció d'estímul de producció de biomassa pel CO<sub>2</sub> elevat (BER) i la taxa de creixement relatiu (RGR).

A *Chamaerops humilis*, l'estimulació de la producció de biomassa també va incrementar amb el temps fins al final de l'experiment, però a diferència de *Cycas revoluta*, el BER no va augmentar de manera lineal durant els 20 mesos. Així, després del novè mes d'exposició a CO<sub>2</sub> elevat, es va trencar la linealitat i es va començar a reduir la velocitat d'increment del BER (Fig. 4.1.7).

A partir de totes les dades de biomassa obtingudes es va generar una correlació entre el BER i la taxa de creixement relatiu (RGR). Els dos paràmetres van presentar una relació negativa, de manera que a major RGR menor BER, és a dir, el CO<sub>2</sub> va estimular més el creixement de les plantes de creixement més lent (Fig. 4.1.8). A la figura també es pot observar com *Chamaerops humilis* va presentar, en general, una taxa de creixement relatiu més elevada que *Cycas revoluta*.

## 4. 2. RESPOSTA FISIOLÒGICA AL CO<sub>2</sub> ELEVAT

L'avaluació de la resposta fisiològica al CO<sub>2</sub> elevat es va realitzar mitjançant l'anàlisi del bescanvi de gasos de la capçada, l'assimilació de CO<sub>2</sub> i la fluorescència de les clorofil·les foliar, la respiració mitocondrial, contingut de carboni i nitrogen, la densitat estomàtica, així com per mitjà d'observacions de talls histològics de fulles.

### 4. 2. 1. BESCANVI DE GASOS DE LA CAPÇADA

Les mesures de bescanvi gasos de la capçada van consistir en la realització i anàlisi de cicles diaris, corbes de resposta a llum, determinació de la taxa de respiració mitocondrial a la llum (R<sub>L</sub>), així com l'obtenció dels punts de compensació (lumínic, de CO<sub>2</sub> i tèrmic).

#### 4. 2. 1. 1. ANÀLISI DELS CICLES DIARIS

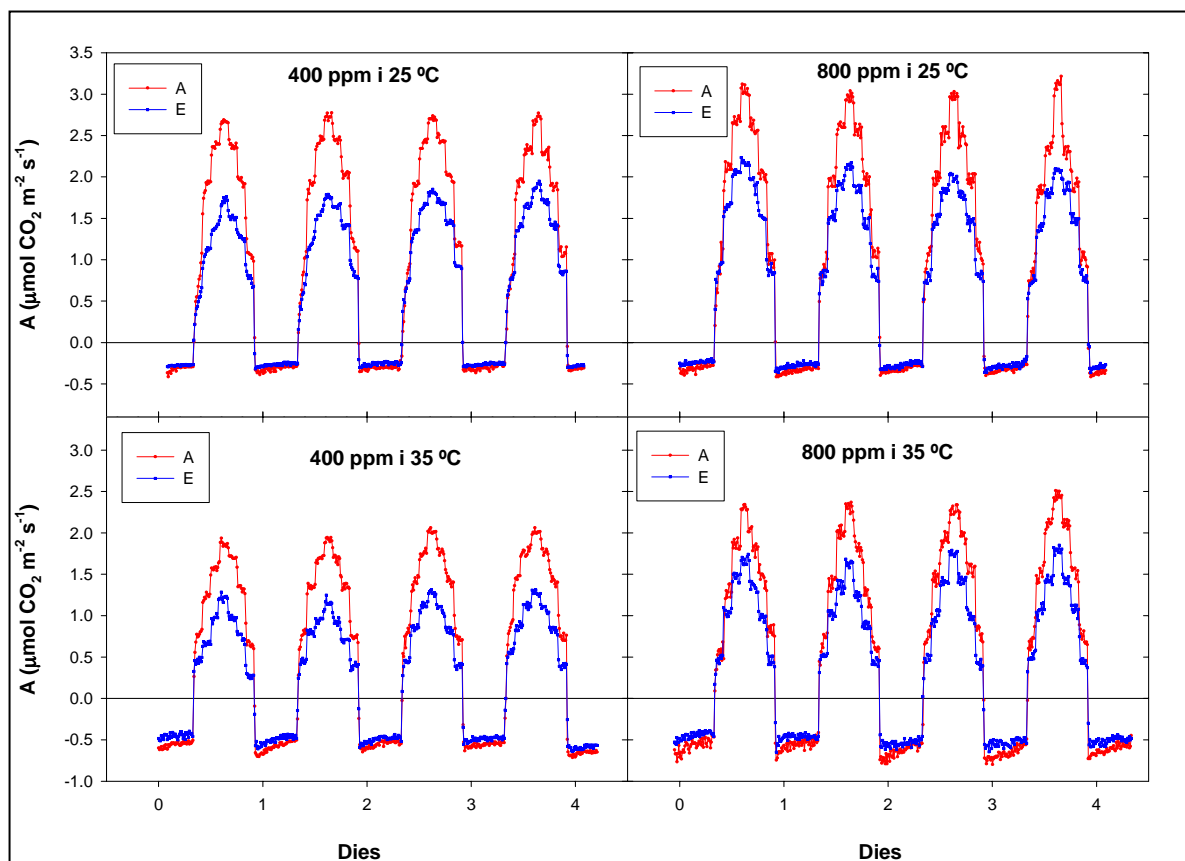
En ambdues espècies, es va caracteritzar el bescanvi de gasos de la capçada de plantes A i plantes crescudes a CO<sub>2</sub> elevat (E) al llarg de cicles diaris, realitzats a dues concentracions CO<sub>2</sub> (400 i 800 ppm) i a dues temperatures (25 i 35°C).

En condicions de foscor, es va observar a *Chamaerops humilis* una assimilació neta de CO<sub>2</sub> negativa, és a dir, respiració, mentre que als períodes amb il·luminació es va donar una assimilació neta de CO<sub>2</sub> positiva (Fig. 4.2.1). Durant el dia, la fotosíntesi neta va augmentar en resposta a l'increment de radiació incident i va disminuir a mesura es desconnectaven una a una les làmpades d'il·luminació. En general, *Chamaerops* va presentar unes taxes fotosintètiques molt baixes, inclús sota condicions òptimes de llum, temperatura i concentració de CO<sub>2</sub>. Pel que fa a la respiració, es pot observar una taxa lleugerament superior a l'inici de la nit, que va anar disminuint progressivament (Fig. 4.2.1).

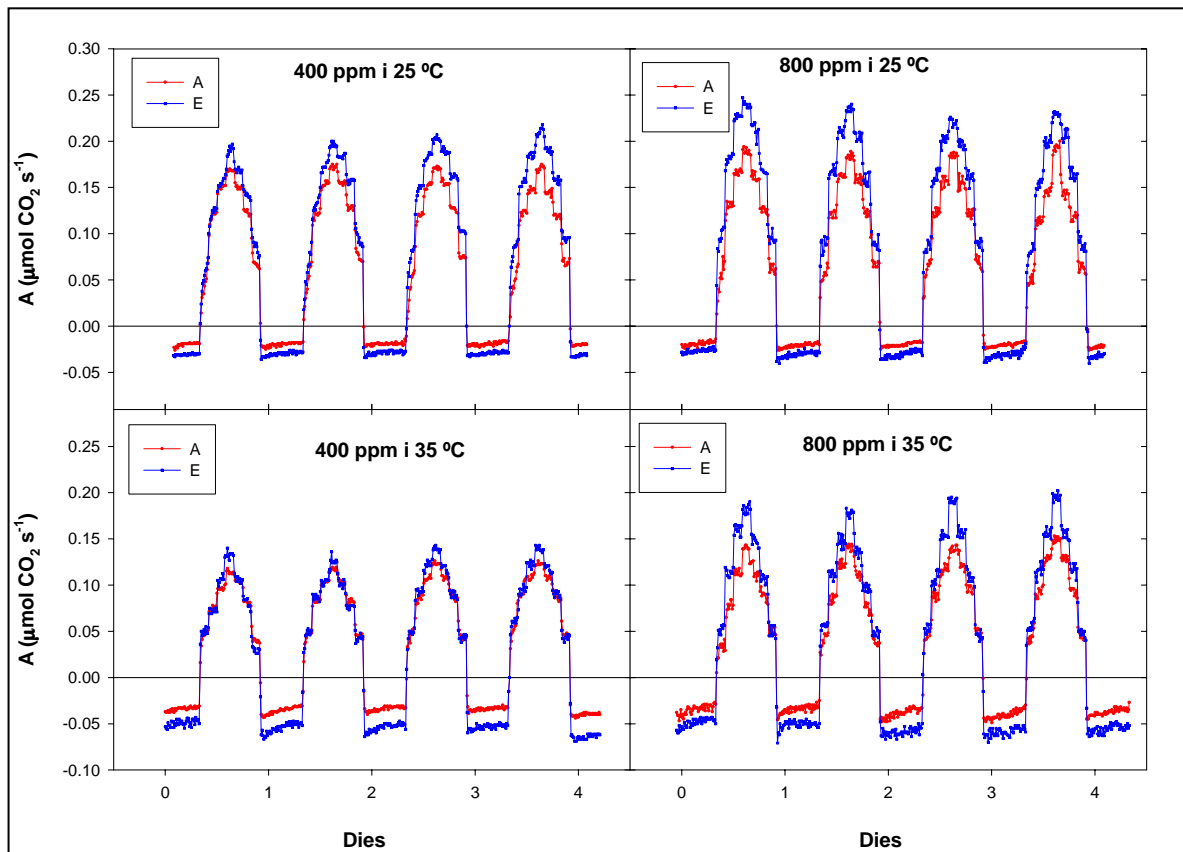
Independentment de les condicions de temperatura i CO<sub>2</sub>, les plantes aclimatades a CO<sub>2</sub> elevat (E) van presentar una marcada disminució de la taxa de fotosíntesi per unitat d'àrea en relació a les plantes A (Fig. 4.2.1). Aquest efecte indirecte del CO<sub>2</sub> va ser més important a 35°C que a 25°C, així com a 400 ppm en comparació a 800 ppm (Taules 4.2.1 i 4.2.2). D'altra banda, es va observar un efecte directe positiu del CO<sub>2</sub> sobre la fotosíntesi, és a dir, la taxa de fotosíntesi a 800 ppm de CO<sub>2</sub> va ser més elevada que a 400 ppm. Aquest increment va ser

superior a les plantes E, així com a 35°C de temperatura (Taulas 4.2.1 i 4.2.2). De manera general, la fotosíntesi a 35°C va ser inferior a la mesurada a 25°C. A diferència de la taxa de fotosíntesi per unitat d'àrea, no es va observar una disminució de la fotosíntesi del conjunt de la capçada a *Chamaerops humilis* després de 20 mesos d'exposició a CO<sub>2</sub> elevat (Fig. 4.2.2). Així, a excepció de la combinació de 400 ppm i 35°C, la integral d'assimilació diària va ser superior a les plantes E (Taulas 4.2.1 i 4.2.2).

Pel que fa a la taxa de respiració per unitat d'àrea, no hi va haver diferències entre tractaments de CO<sub>2</sub> (A i E) a les mesures realitzades a 25°C (Taula 4.2.1). En canvi, a 35°C es va produir una lleugera reducció de la taxa a les plantes E (Taula 4.2.2). En cap cas es va observar un efecte important del CO<sub>2</sub> de mesura sobre la taxa de respiració. D'altra banda, un increment de 10°C en la temperatura, pràcticament va duplicar la taxa de respiració (Taulas 4.2.1 i 4.2.2). La integral diària de respiració del conjunt de la capçada a *Chamaerops humilis* va ser molt superior a les plantes E (Fig. 4.2.2), especialment a 35°C (Taula 4.2.2).



**Figura 4.2.1.** Assimilació neta de CO<sub>2</sub> per unitat d'àrea de la capçada a *Chamaerops humilis*, enregistrada en continu durant 4 dies complets. Es van obtenir cicles diaris sota diverses condicions de temperatura (25 i 35°C) i concentració de CO<sub>2</sub> (400 i 800 ppm).



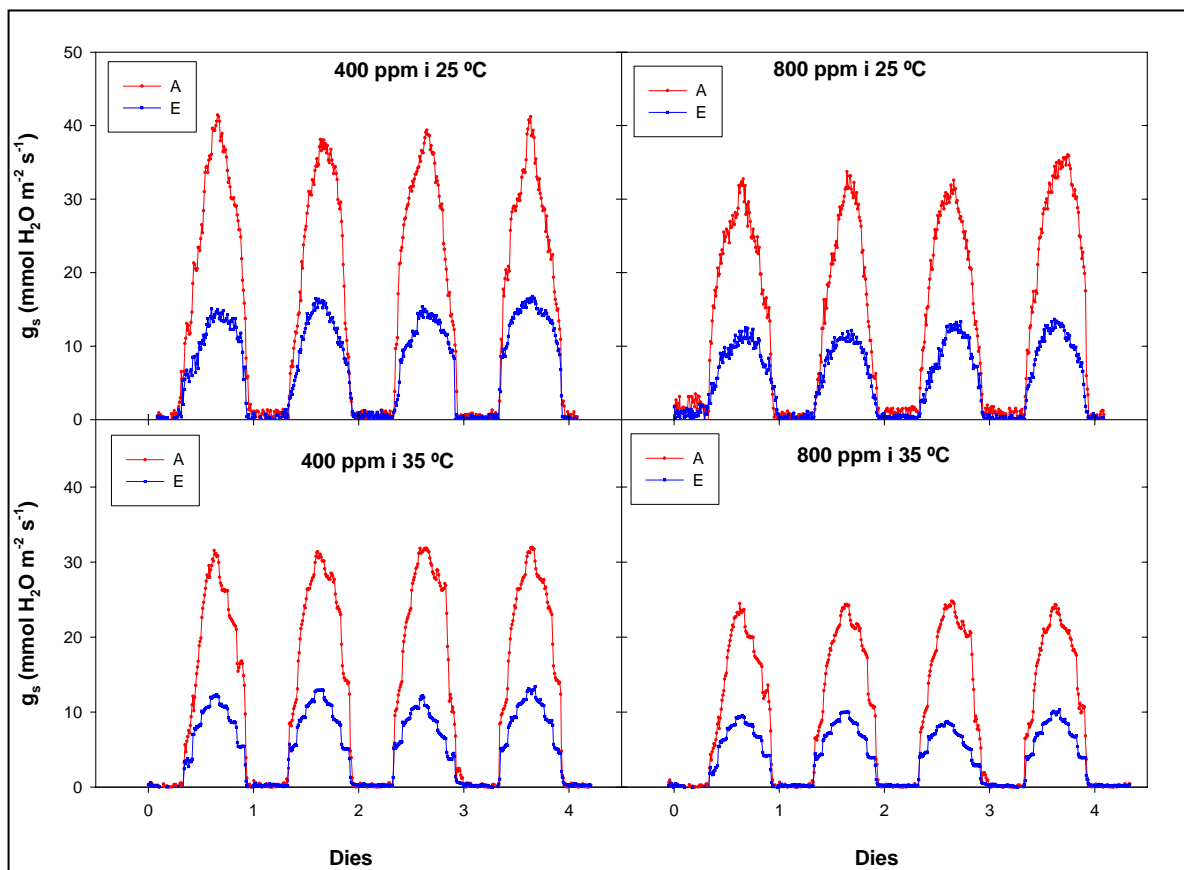
**Figura 4.2.2.** Cicles diaris de l'assimilació neta de CO<sub>2</sub> del total de biomassa de la cambra corresponent a *Chamaerops humilis*, sota diverses condicions de temperatura (25 i 35°C) i concentració de CO<sub>2</sub> (400 i 800 ppm).

El balanç entre fotosíntesi i respiració es va veure alterat pel CO<sub>2</sub> i la temperatura, tant per unitat d'àrea foliar com a escala de capçada. El balanç per unitat d'àrea va seguir el mateix patró que la fotosíntesi per àrea, descrit anteriorment. En canvi, el balanç integral només es va comportar com la integral de fotosíntesi a 25°C (Taula 4.2.1), mentre que a 35°C es va observar una reducció a les plantes E quan la concentració de CO<sub>2</sub> era de 400 ppm i un augment a 800 ppm (Taula 4.2.2).

A partir de l'inici del dia, la conductància estomàtica va augmentar seguint el cicle diari, de manera més progressiva que la fotosíntesi, fins arribar a nivells màxims al migdia i disminuir posteriorment (Fig. 4.2.3). A tots els cicles, els valors absoluts obtinguts de conductància estomàtica van ser força baixos. La conductància estomàtica es va veure dràsticament reduïda per efecte del tractament de CO<sub>2</sub> elevat a totes les condicions ambientals de mesura de les cambres (Fig. 4.2.3 i Taules 4.2.1 i 4.2.2). Encara que inferior, també es va observar una

disminució per efecte directe del  $\text{CO}_2$  quan la concentració de  $\text{CO}_2$  va ser de 800 ppm. La transpiració es va reduir proporcionalment a la conductància en resposta al  $\text{CO}_2$  elevat. En el cas de la temperatura, l'augment tèrmic també va comportar un descens en l'obertura estomàtica. Tot i això, la transpiració va augmentar en resposta a l'increment de temperatura (Taules 4.2.1 i 4.2.2), a causa d'un major dèficit de pressió parcial de vapor de l'aire (VPD) a la temperatura de  $35^\circ\text{C}$ .

El  $\text{CO}_2$  elevat va incrementar l'eficiència en l'ús de l'aigua (WUE) tant a llarg termini com a curt termini. Quant a l'augment de temperatura, va reduir significativament el WUE (Taules 4.2.1 i 4.2.2).



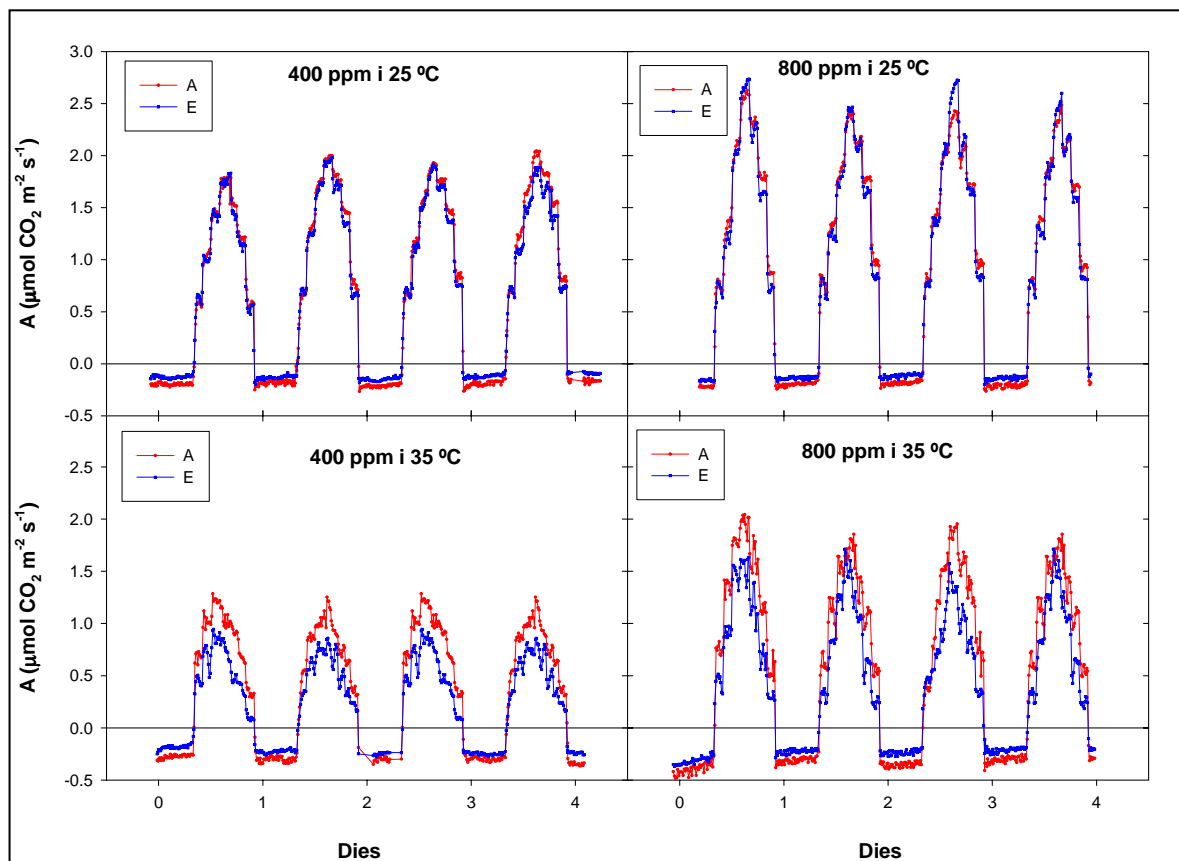
**Figura 4.2.3.** Cicles diaris de conductància estomàtica de la capçada a *Chamaerops humilis* sota diverses condicions de temperatura ( $25$  i  $35^\circ\text{C}$ ) i concentració de  $\text{CO}_2$  (400 i 800 ppm).

**Taula 4.2.1.** Resum dels principals paràmetres de bescanvi de gasos obtinguts mitjançant l'anàlisi dels cicles diaris a *Chamaerops humilis*, realitzats a 25°C de temperatura (n=4). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre mitjanes (p<0.05).

Paràmetre	25°C			
	400 ppm		800 ppm	
	A	E	A	E
<b>A</b> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	1.86 $\pm$ 0.01 c	1.28 $\pm$ 0.05 a	2.02 $\pm$ 0.03 d	1.49 $\pm$ 0.03 b
<b>Integral A</b> (mmol CO <sub>2</sub> dia <sup>-1</sup> )	5.8 $\pm$ 0.1 a	7.2 $\pm$ 0.3 c	6.3 $\pm$ 0.1 b	8.3 $\pm$ 0.2 d
<b>E</b> (mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	0.34 $\pm$ 0.01 d	0.15 $\pm$ 0.01 b	0.29 $\pm$ 0.02 c	0.12 $\pm$ 0.01 a
<b>g<sub>s</sub></b> (mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	26.8 $\pm$ 0.6 d	11.7 $\pm$ 0.6 b	23.1 $\pm$ 1.2 c	8.9 $\pm$ 0.2 a
<b>WUE</b> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O}^{-1}$ )	5.09 $\pm$ 0.12 a	8.45 $\pm$ 0.44 c	7.04 $\pm$ 0.62 b	13.42 $\pm$ 0.50 d
<b>R<sub>D</sub></b> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	0.30 $\pm$ 0.01 ab	0.26 $\pm$ 0.01 a	0.33 $\pm$ 0.01 b	0.28 $\pm$ 0.01 a
<b>Integral R<sub>D</sub></b> (mmol CO <sub>2</sub> dia <sup>-1</sup> )	0.68 $\pm$ 0.02 a	1.04 $\pm$ 0.03 b	0.73 $\pm$ 0.01 a	1.10 $\pm$ 0.01 b
<b>Balanç A-R</b> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	1.56 $\pm$ 0.02 c	1.02 $\pm$ 0.05 a	1.66 $\pm$ 0.03 d	1.21 $\pm$ 0.03 b
<b>Balanç integral</b> (mmol CO <sub>2</sub> dia <sup>-1</sup> )	5.1 $\pm$ 0.1 a	6.2 $\pm$ 0.3 c	5.6 $\pm$ 0.1 b	7.2 $\pm$ 0.2 d

**Taula 4.2.2.** Resum dels principals paràmetres de bescanvi de gasos obtinguts mitjançant l'anàlisi dels cicles diaris a *Chamaerops humilis*, realitzats a 35°C de temperatura (n=4). Lletres diferents indiquen diferències significatives entre mitjanes (p<0.05).

Paràmetre	35°C			
	400 ppm		800 ppm	
	A	E	A	E
<b>A</b> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	1.36 $\pm$ 0.03 c	0.80 $\pm$ 0.03 a	1.64 $\pm$ 0.04 d	1.06 $\pm$ 0.02 b
<b>Integral A</b> (mmol CO <sub>2</sub> dia <sup>-1</sup> )	4.18 $\pm$ 0.10 a	4.40 $\pm$ 0.16 ab	4.69 $\pm$ 0.11 b	5.83 $\pm$ 0.12 c
<b>E</b> (mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	0.67 $\pm$ 0.02 d	0.27 $\pm$ 0.01 b	0.52 $\pm$ 0.01 c	0.21 $\pm$ 0.01 a
<b>g<sub>s</sub></b> (mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	22.1 $\pm$ 0.5 d	8.6 $\pm$ 0.2 b	17.0 $\pm$ 0.4 c	6.7 $\pm$ 0.2 a
<b>WUE</b> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O}^{-1}$ )	2.05 $\pm$ 0.08 a	3.01 $\pm$ 0.15 b	2.81 $\pm$ 0.09 b	5.02 $\pm$ 0.21 c
<b>R<sub>D</sub></b> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	0.56 $\pm$ 0.01 b	0.49 $\pm$ 0.02 a	0.62 $\pm$ 0.04 b	0.51 $\pm$ 0.02 a
<b>Integral R<sub>D</sub></b> (mmol CO <sub>2</sub> dia <sup>-1</sup> )	1.23 $\pm$ 0.04 a	1.91 $\pm$ 0.04 b	1.35 $\pm$ 0.08 a	2.01 $\pm$ 0.09 b
<b>Balanç A-R</b> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	0.80 $\pm$ 0.04 c	0.31 $\pm$ 0.03 a	0.98 $\pm$ 0.06 d	0.55 $\pm$ 0.04 b
<b>Balanç integral</b> (mmol CO <sub>2</sub> dia <sup>-1</sup> )	2.95 $\pm$ 0.12 b	2.49 $\pm$ 0.14 a	3.34 $\pm$ 0.17 c	3.81 $\pm$ 0.20 d



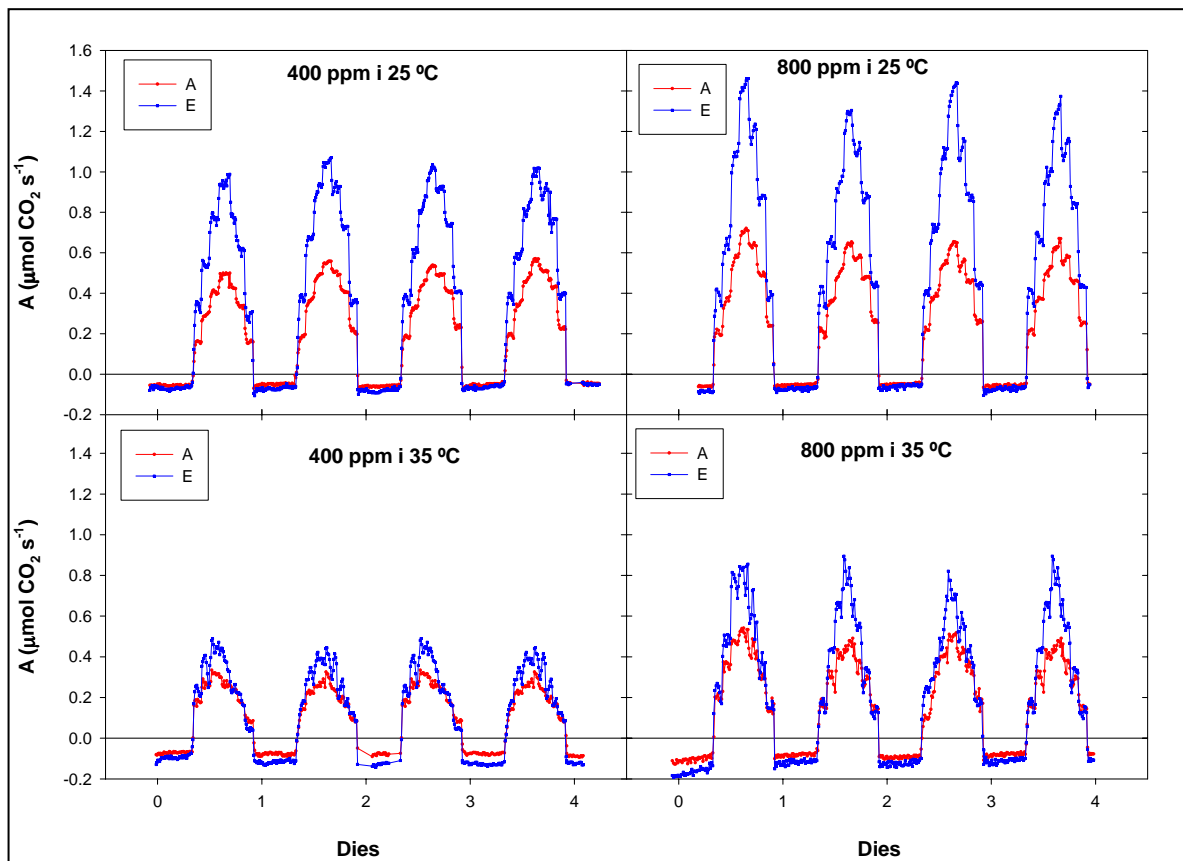
**Figura 4.2.4.** Assimilació neta de CO<sub>2</sub> per unitat d'àrea de la capçada a *Cycas revoluta*, enregistrada en continu durant 4 dies complets. Es van obtenir cicles diaris sota diverses condicions de temperatura (25 i 35°C) i concentració de CO<sub>2</sub> (400 i 800 ppm).

A *Cycas revoluta* la cinètica general dels cicles diaris va presentar una assimilació neta de CO<sub>2</sub> positiva durant el dia i una emissió nocturna de CO<sub>2</sub> (Fig. 4.2.4). La fotosíntesi neta va augmentar fins al migdia i va disminuir durant la tarda. Les taxes fotosintètiques i respiratòries obtingudes van ser extremadament baixes, fins i tot inferiors a les de *Chamaerops humilis*.

El CO<sub>2</sub> de creixement no va tenir cap efecte sobre la taxa de fotosíntesi per unitat d'àrea a 25°C de temperatura (Taula 4.2.3). En canvi, a 35°C es va observar una disminució de la fotosíntesi per àrea a les plantes aclimatades a CO<sub>2</sub> elevat en relació a les plantes A (Taula 4.2.4). En tots els casos, la taxa de fotosíntesi mesurada a 800 ppm va ser significativament més elevada que a 400 ppm, produint-se un efecte més elevat a 35°C. L'efecte directe del CO<sub>2</sub> va ser superior a les plantes E (Taula 4.2.3 i 4.2.4). L'increment de temperatura va reduir de manera important la fotosíntesi, afectant amb més intensitat les plantes E. Quant a la



fotosíntesi del conjunt de la capçada, a totes les combinacions ambientals les plantes sotmeses a  $\text{CO}_2$  elevat van mostrar valors més elevats que les plantes A (Fig. 4.2.5), essent les diferències superiors a  $25^\circ\text{C}$ .

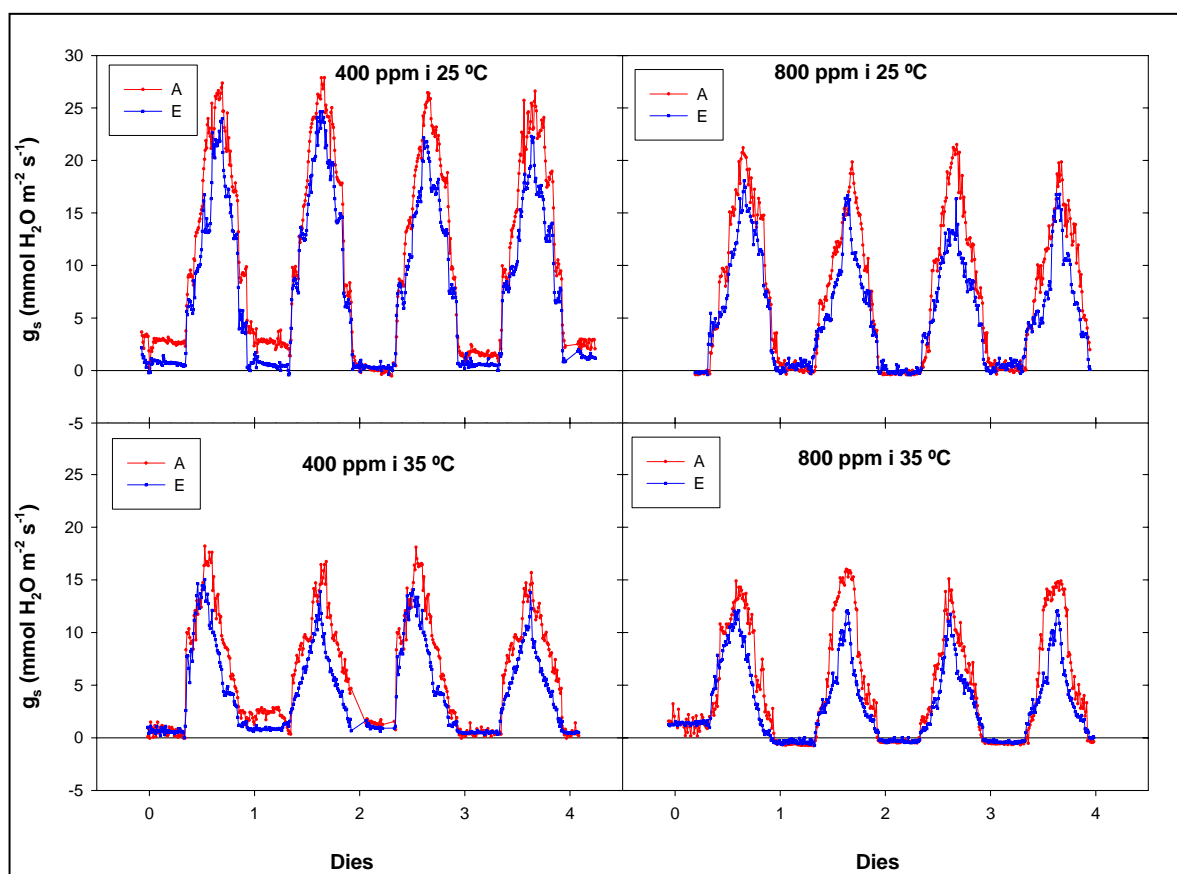


**Figura 4.2.5.** Cicles diaris de l'assimilació neta de  $\text{CO}_2$  del total de biomassa de la cambra corresponent a *Cycas revoluta*, sota diverses condicions de temperatura ( $25$  i  $35^\circ\text{C}$ ) i concentració de  $\text{CO}_2$  ( $400$  i  $800$  ppm).

La taxa de respiració per unitat d'àrea es va reduir en resposta a una exposició continuada a  $\text{CO}_2$  elevat, mentre que no es va produir un efecte directe del  $\text{CO}_2$  (Taules 4.2.3 i 4.2.4). La taxa de respiració a  $35^\circ\text{C}$  va ser molt més elevada que a  $25^\circ\text{C}$ . (Taules 4.2.3 i 4.2.4). Pel que fa a la integral diària de respiració del conjunt de la capçada, va ser significativament superior a les plantes E (Fig. 4.2.5 i Taules 4.2.3 i 4.2.4).

El balanç entre fotosíntesi i respiració es va veure alterat pel  $\text{CO}_2$  i la temperatura, tant per unitat d'àrea foliar com pel que fa a la integral del conjunt de la capçada. De fet els balanços es van comportar de manera anàloga a la fotosíntesi respectiva (per unitat d'àrea i integral).

Així, per unitat d'àrea no hi va haver diferències entre tractaments de CO<sub>2</sub> (A i E) a 25°C (Taula 4.2.3), però sí a 35°C, disminuint l'assimilació al tractament E (Taula 4.2.4). L'increment de 10°C en la temperatura també va reduir el balanç. El guany net de carboni de la capçada va ser superior a les plantes crescudes a CO<sub>2</sub> elevat. L'efecte directe del CO<sub>2</sub> va ser positiu pel balanç de totes les combinacions de temperatura i CO<sub>2</sub> de creixement (Taules 4.2.3 i 4.2.4).



**Fig. 4.2.6.** Cicles diaris de conductància estomàtica de la capçada a *Cycas revoluta* sota diverses condicions de temperatura (25 i 35°C) i concentració de CO<sub>2</sub> (400 i 800 ppm).

Des de l'inici del període d'il·luminació fins al migdia, la conductància estomàtica va augmentar progressivament, per disminuir posteriorment fins l'inici del període de fosc (Fig. 4.2.6). Els valors absoluts mesurats de conductància estomàtica van ser molt baixos. Tant l'increment de CO<sub>2</sub>, per efecte directe i indirecte, com l'augment de temperatura, van reduir la conductància estomàtica (Fig. 4.2.6 i Taules 4.2.3 i 4.2.4). La transpiració es va

reduir proporcionalment a la conductància a tots els casos amb l'excepció de la temperatura, per l'efecte del VPD comentat anteriorment (Taules 4.2.3 i 4.2.4).

Així, en general el CO<sub>2</sub> elevat va incrementar l'eficiència en l'ús de l'aigua (WUE) tant a llarg termini com a curt termini. Únicament no hi va haver diferències entre tractaments a la combinació de 400 ppm de CO<sub>2</sub> i 35°C. El WUE es va veure reduït per l'increment de temperatura (Taules 4.2.3 i 4.2.4).

**Taula 4.2.3.** Resum dels principals paràmetres de bescanvi de gasos obtinguts mitjançant l'anàlisi dels cicles diaris a *Cycas revoluta*, realitzats a 25°C de temperatura (n=4).

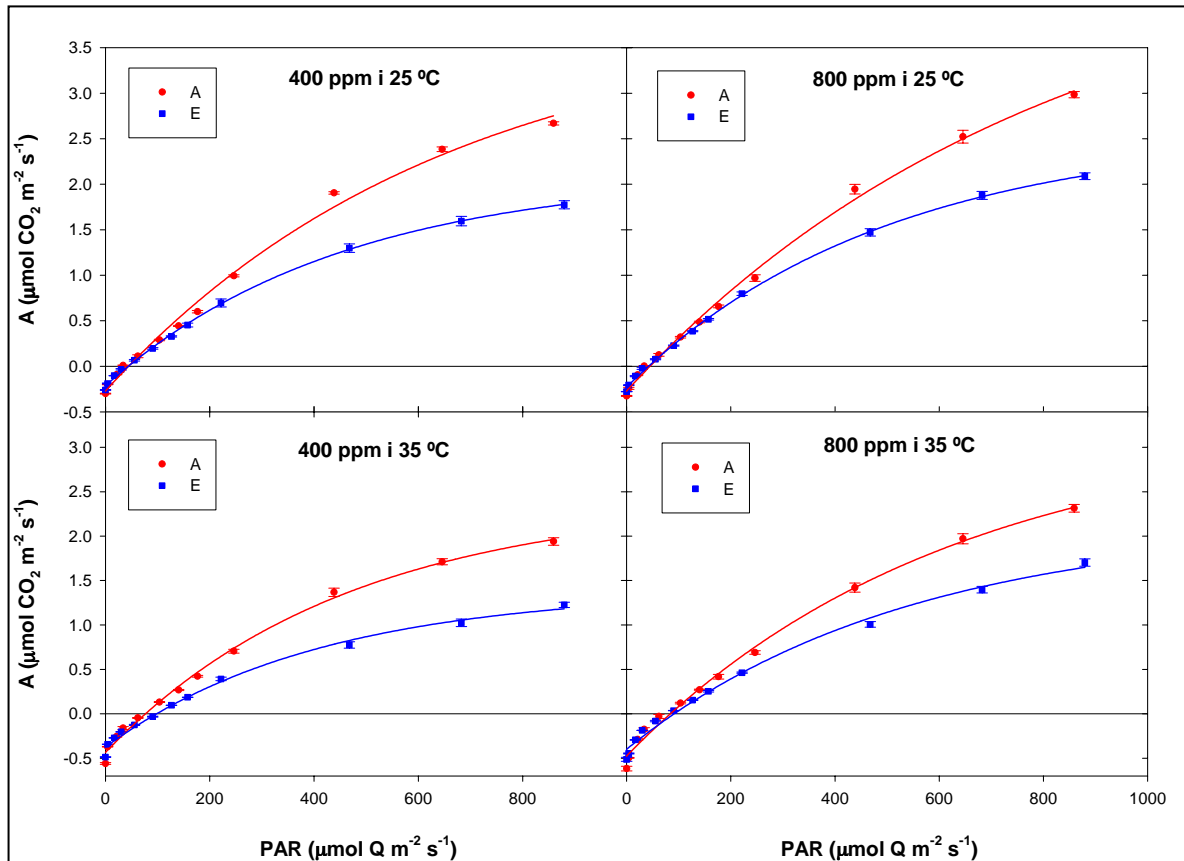
Paràmetre	25°C			
	400 ppm		800 ppm	
	A	E	A	E
<b>A</b> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	1.31 $\pm$ 0.05 a	1.24 $\pm$ 0.03 a	1.61 $\pm$ 0.01 b	1.57 $\pm$ 0.03 b
<b>Integral A</b> ( $\text{mmol CO}_2 \text{ dia}^{-1}$ )	18.4 $\pm$ 0.7 a	33.8 $\pm$ 0.9 c	22.0 $\pm$ 0.2 b	41.9 $\pm$ 0.7 d
<b>E</b> ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	0.25 $\pm$ 0.01 d	0.20 $\pm$ 0.01 c	0.17 $\pm$ 0.01 b	0.13 $\pm$ 0.01 a
<b>g<sub>s</sub></b> ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	17.1 $\pm$ 0.2 d	13.4 $\pm$ 0.5 c	11.5 $\pm$ 0.4 b	8.5 $\pm$ 0.5 a
<b>WUE</b> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O}^{-1}$ )	5.25 $\pm$ 0.20 a	6.28 $\pm$ 0.18 b	9.43 $\pm$ 0.24 c	12.36 $\pm$ 0.58 d
<b>R<sub>D</sub></b> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	0.19 $\pm$ 0.01 b	0.13 $\pm$ 0.01 a	0.20 $\pm$ 0.01 b	0.13 $\pm$ 0.01 a
<b>Integral R<sub>D</sub></b> ( $\text{mmol CO}_2 \text{ dia}^{-1}$ )	1.95 $\pm$ 0.08 a	2.58 $\pm$ 0.16 b	1.91 $\pm$ 0.09 a	2.46 $\pm$ 0.14 b
<b>Balanç A-R</b> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	1.11 $\pm$ 0.06 a	1.11 $\pm$ 0.04 a	1.42 $\pm$ 0.02 b	1.44 $\pm$ 0.03 b
<b>Balanç integral</b> ( $\text{mmol CO}_2 \text{ dia}^{-1}$ )	16.5 $\pm$ 0.8 a	31.3 $\pm$ 1.1 c	20.1 $\pm$ 0.3 b	39.4 $\pm$ 0.8 d

**Taula 4.2.4.** Resum dels principals paràmetres de bescanvi de gasos obtinguts mitjançant l'anàlisi dels cicles diaris a *Cycas revoluta*, realitzats a 35°C de temperatura (n=4).

Paràmetre	35°C			
	400 ppm		800 ppm	
	A	E	A	E
<b>A</b> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	0.80 $\pm$ 0.03 b	0.52 $\pm$ 0.01 a	1.20 $\pm$ 0.04 c	0.85 $\pm$ 0.03 b
<b>Integral A</b> ( $\text{mmol CO}_2 \text{ dia}^{-1}$ )	10.4 $\pm$ 0.3 a	13.5 $\pm$ 0.2 b	16.0 $\pm$ 0.5 c	22.5 $\pm$ 0.8 d
<b>E</b> ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	0.33 $\pm$ 0.01 c	0.24 $\pm$ 0.01 b	0.25 $\pm$ 0.01 b	0.18 $\pm$ 0.01 a
<b>g<sub>s</sub></b> ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	9.6 $\pm$ 0.1 d	6.7 $\pm$ 0.3 b	7.7 $\pm$ 0.4 c	5.2 $\pm$ 0.4 a
<b>WUE</b> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O}^{-1}$ )	2.44 $\pm$ 0.09 a	2.22 $\pm$ 0.07 a	4.76 $\pm$ 0.16 b	4.68 $\pm$ 0.16 b
<b>R<sub>D</sub></b> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	0.29 $\pm$ 0.01 b	0.24 $\pm$ 0.01 a	0.32 $\pm$ 0.02 b	0.22 $\pm$ 0.01 a
<b>Integral R<sub>D</sub></b> ( $\text{mmol CO}_2 \text{ dia}^{-1}$ )	2.72 $\pm$ 0.06 a	4.38 $\pm$ 0.15 b	3.04 $\pm$ 0.12 a	4.18 $\pm$ 0.15 b
<b>Balanç A-R</b> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	0.51 $\pm$ 0.04 b	0.28 $\pm$ 0.01 a	0.88 $\pm$ 0.05 c	0.63 $\pm$ 0.05 b
<b>Balanç integral</b> ( $\text{mmol CO}_2 \text{ dia}^{-1}$ )	7.7 $\pm$ 0.4 a	9.2 $\pm$ 0.3 b	13.0 $\pm$ 0.7 c	18.3 $\pm$ 0.9 d

## 4. 2. 1. 2. CORBES DE RESPOSTA A LA LLUM

Igual que en el cas dels cicles diaris, es van realitzar corbes de resposta de l'assimilació neta de  $\text{CO}_2$  de la capçada a la llum ( $A/\text{PPFD}$ ) en ambdues espècies i tractaments de  $\text{CO}_2$  (A i E) a 400 i 800 ppm de  $\text{CO}_2$  i a 25 i 35°C.

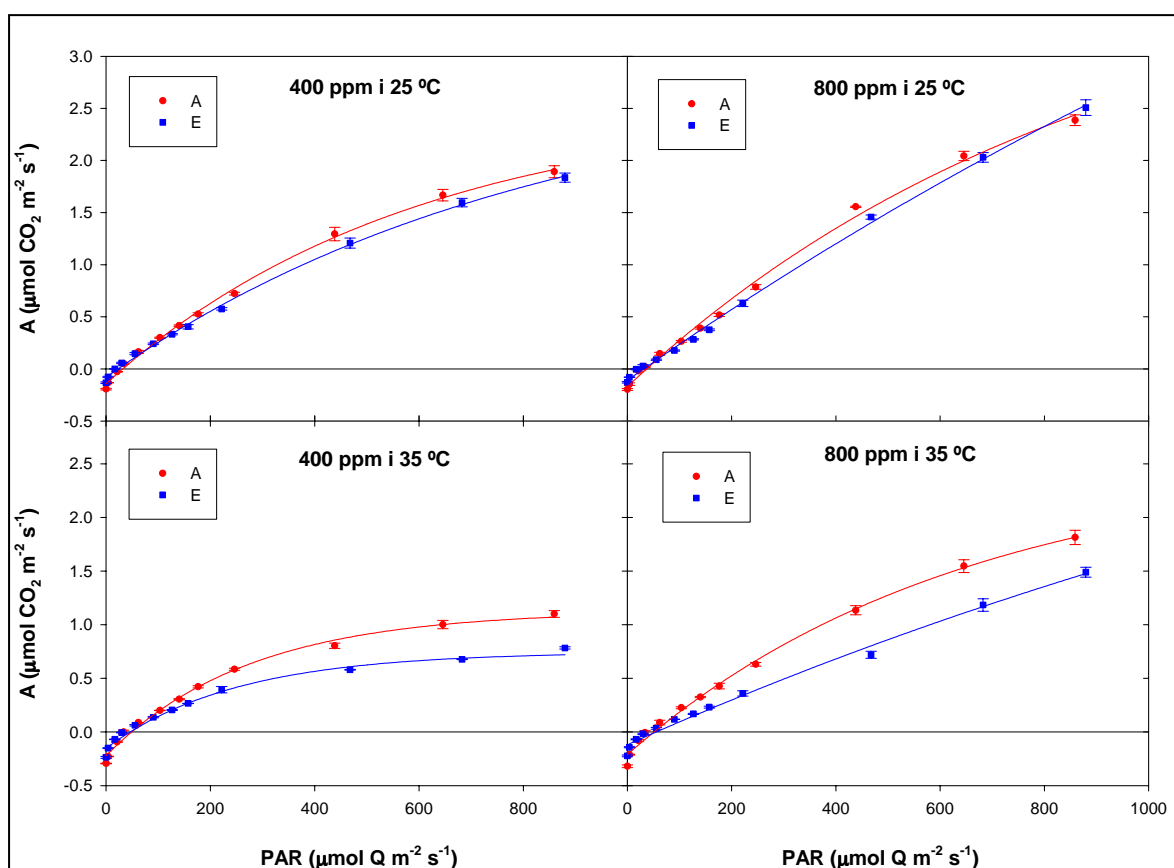


**Figura 4.2.7.** Corbes de resposta de l'assimilació neta de  $\text{CO}_2$  de la capçada a la llum ( $A/\text{PPFD}$ ) a *Chamaerops humilis* sota diverses condicions de temperatura (25 i 35°C) i concentració de  $\text{CO}_2$  (400 i 800 ppm) (n=3).

A *Chamaerops humilis*, es pot observar un increment exponencial de l'assimilació neta de  $\text{CO}_2$  a l'augmentar la radiació incident. No obstant això, a totes les condicions ambientals de mesura es pot observar una clara disminució en les corbes de resposta fotosintètica a la llum de les plantes sotmeses a alt  $\text{CO}_2$  (E) en comparació amb les plantes A (Fig. 4.2.7). D'altra banda, la concentració elevada de  $\text{CO}_2$  (800 ppm) va estimular per efecte directe la fotosíntesi, mentre que la temperatura elevada (35°C) va donar lloc a una reducció

fotosintètica (Fig. 4.2.7). En general, s'observa que amb la màxima radiació aplicada no va aconseguir saturar totalment la fotosíntesi, per això no es van calcular la capacitat fotosintètica ( $A_{\text{sat}}$ ) ni el punt de saturació lumínic a partir de les corbes.

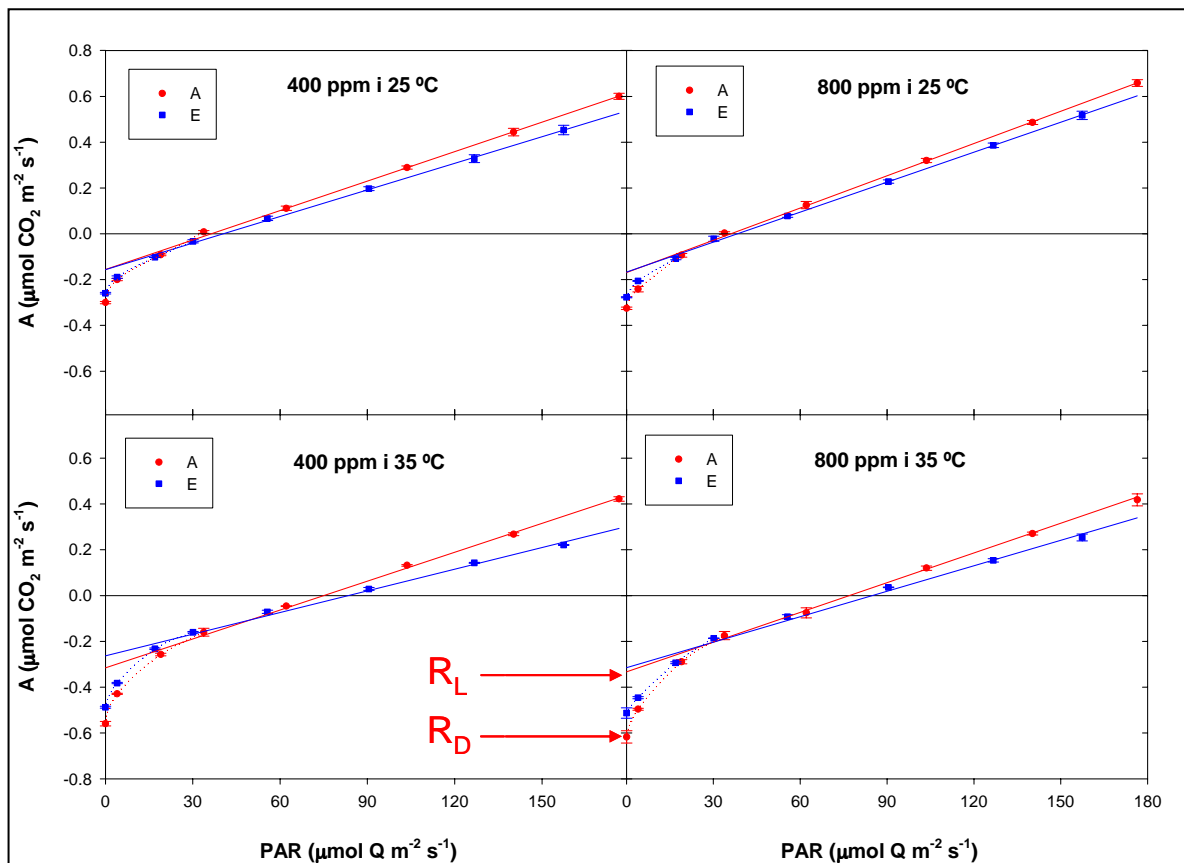
A *Cycas revoluta* l'assimilació neta de  $\text{CO}_2$  també va respondre positivament a l'increment de radiació. Les corbes de resposta fotosintètica a la llum realitzades a  $25^\circ\text{C}$  no presenten diferències entre tractaments de  $\text{CO}_2$  (Fig. 4.2.8). En canvi, a  $35^\circ\text{C}$  s'observa una reducció fotosintètica a les plantes E. L'efecte directe estimulador del  $\text{CO}_2$  elevat (800 ppm) sobre la fotosíntesi va ser molt important. Un augment de temperatura de  $10^\circ\text{C}$  va tenir un efecte molt negatiu sobre l'activitat fotosintètica, especialment sobre les plantes E (Fig. 4.2.8). En el cas de *Cycas* sembla que la màxima radiació incident que es va aconseguir va quedar encara més lluny de saturar la fotosíntesi de la capçada, amb l'excepció de les mesures realitzades a 400 ppm de  $\text{CO}_2$  amb una temperatura de  $35^\circ\text{C}$ .



**Figura 4.2.8.** Corbes de resposta de l'assimilació neta de  $\text{CO}_2$  de la capçada a la llum (A/PPFD) a *Cycas revoluta* sota diverses condicions de temperatura ( $25$  i  $35^\circ\text{C}$ ) i concentració de  $\text{CO}_2$  (400 i 800 ppm) ( $n=3$ ).

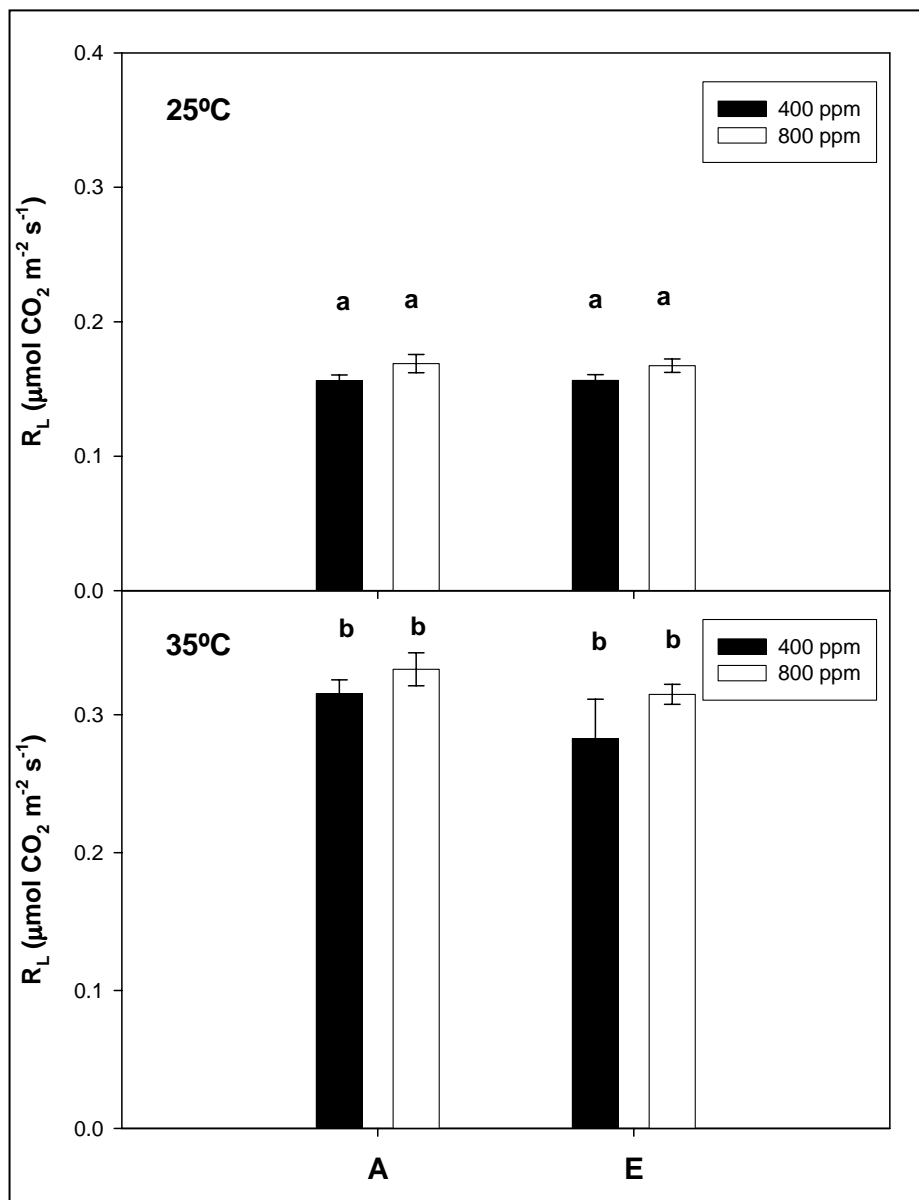
## 4. 2. 1. 3. TAXA DE RESPIRACIÓ MITOCONDRIAL A LA LLUM

La figura 4.2.9 mostra la resposta de l'assimilació neta de  $\text{CO}_2$  de la capçada de *Chamaerops humilis* a intensitats molt baixes de PPFD. Inicialment la resposta de la corba va ser lineal, però en reduir la intensitat de radiació per sota del punt de compensació lumínic es va produir un canvi de pendent i l'assimilació de  $\text{CO}_2$  va començar a disminuir a més velocitat. Així, el valor de respiració mitocondrial a la foscor ( $R_D$ ) es va mesurar directament quan la radiació era igual a 0, mentre que la taxa de respiració mitocondrial a la llum ( $R_L$ ) es va estimar extrapolant la part lineal de la corba fins al punt de tall amb l'eix d'ordenades (Fig. 4.2.9).



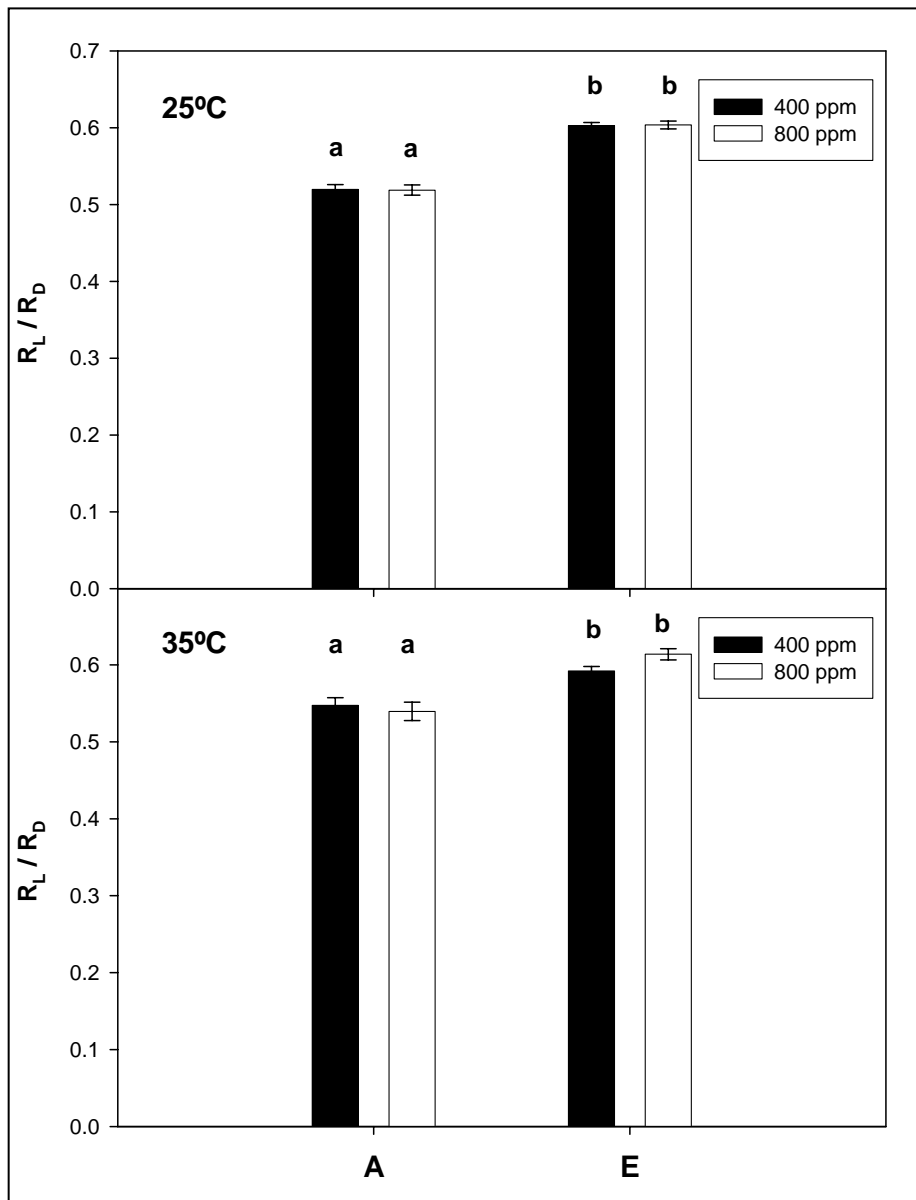
**Figura 4.2.9.** Assimilació neta de  $\text{CO}_2$  de *Chamaerops humilis* a intensitats molt baixes de PPFD sota diverses condicions de temperatura (25 i 35°C) i concentració de  $\text{CO}_2$  (400 i 800 ppm). La taxa de respiració a la llum ( $R_L$ ) es va estimar extrapolant la secció lineal de la corba de llum fins a  $\text{PPFD} = 0$ . El valor d'assimilació neta de  $\text{CO}_2$  en aquest punt correspon a  $R_L$ .  $R_D$ : respiració mitocondrial a la foscor.

La taxa de respiració a la llum a *Chamaerops humilis* mesurada a 25°C, no va presentar diferències significatives entre tractaments. L'increment de temperatura va augmentar significativament  $R_L$  a tots els tractaments, però de manera lleugerament menor a plantes aclimatades a  $\text{CO}_2$  elevat mesurades a concentració ambiental (Fig. 4.2.10).



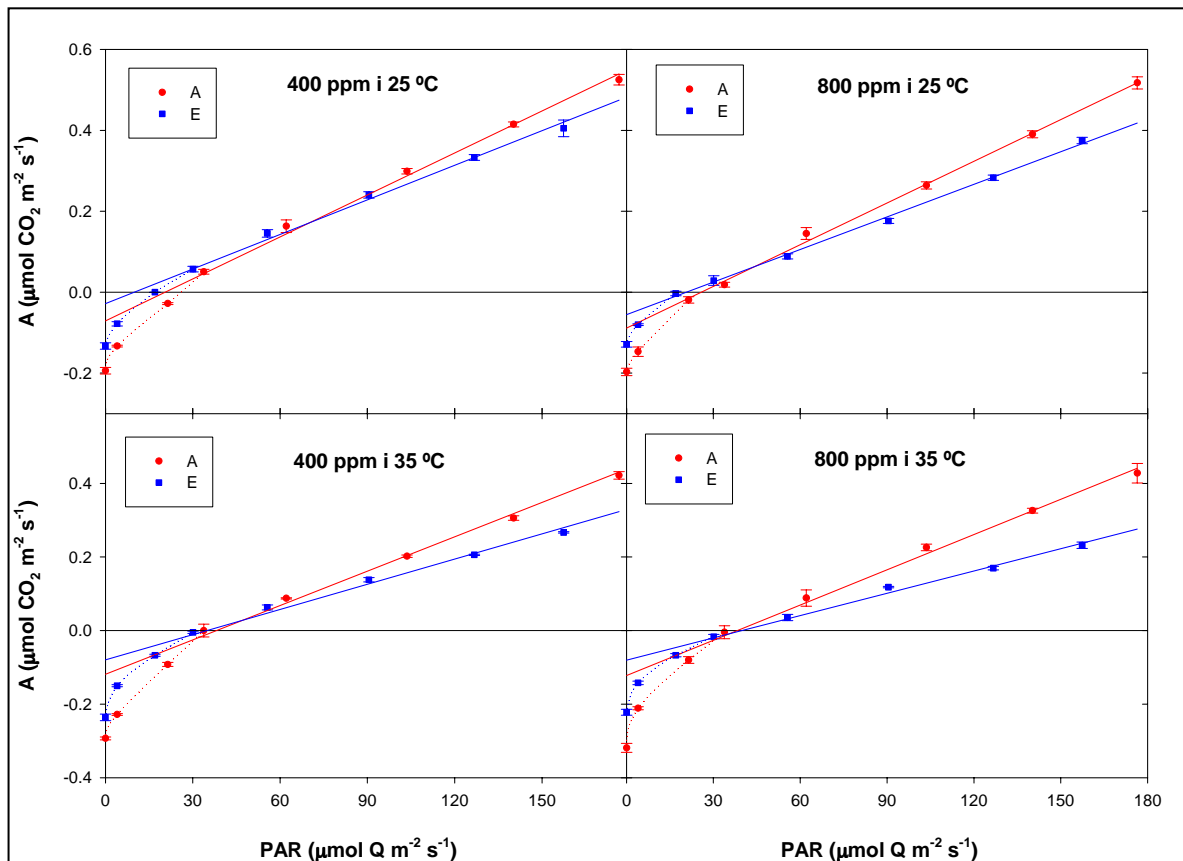
**Figura 4.2.10.** Efectes del  $\text{CO}_2$  i la temperatura sobre la taxa de respiració mitocondrial a la llum ( $R_L$ ) de la capçada a *Chamaerops humilis* ( $n=3$ ).

El quocient  $R_L / R_D$ , el qual reflexa la fracció de respiració mitocondrial no inhibida per efecte de la llum, va ser significativament més alt a les plantes aclimatades a  $CO_2$  elevat. En general es pot considerar que no es va veure afectat de manera directa pel  $CO_2$  elevat. La temperatura tampoc va tenir cap efecte sobre aquest paràmetre (Fig. 4.2.11).



**Figura 4.2.11.** Efectes del  $CO_2$  i la temperatura sobre el quocient  $R_L / R_D$  a *Chamaerops humilis* (n=3).

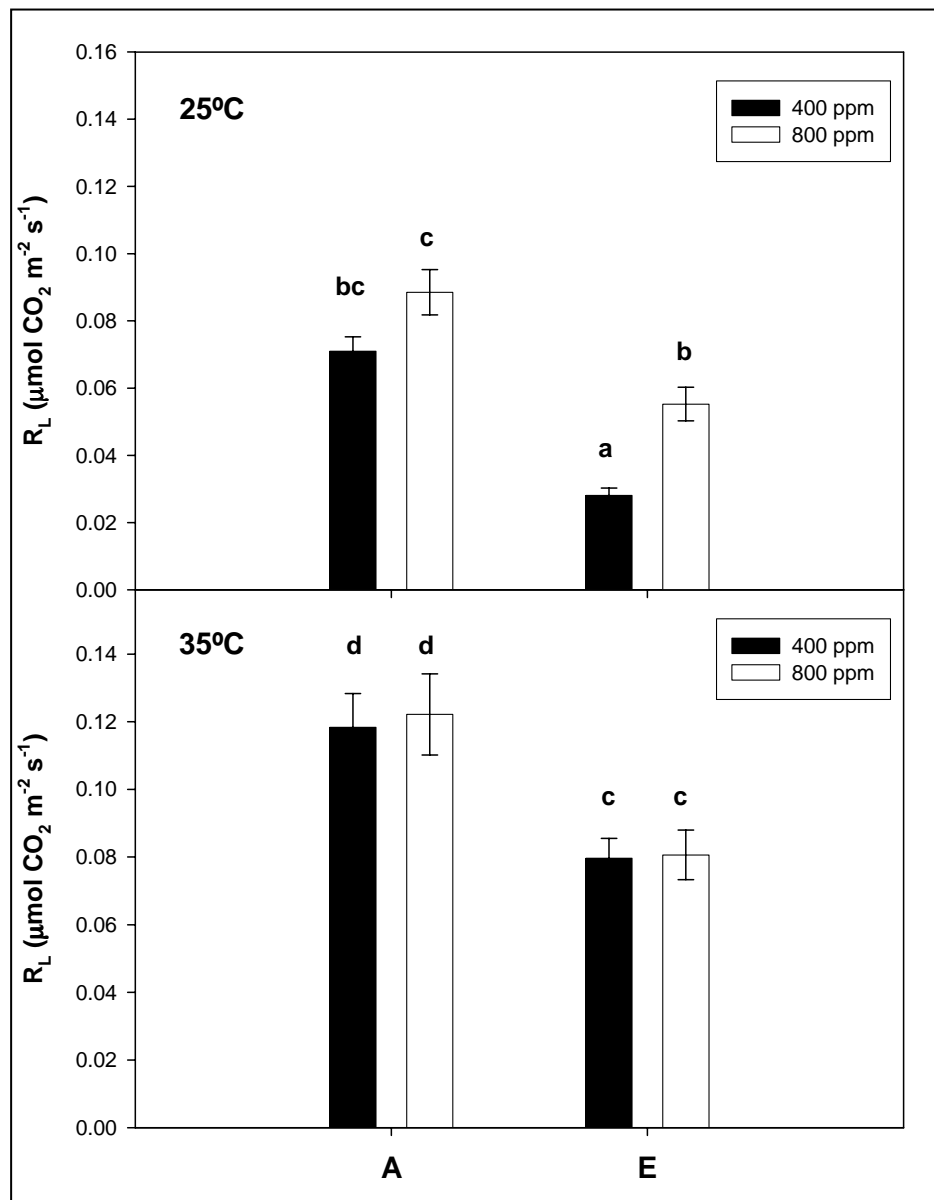




**Figura 4.2.12.** Resposta de l'assimilació neta de  $\text{CO}_2$  de *Cycas revoluta* a intensitats molt baixes de PPFD per estimar la taxa de respiració mitocondrial a la llum ( $R_L$ ) de la capçada sota diverses condicions de temperatura (25 i 35°C) i concentració de  $\text{CO}_2$  (400 i 800 ppm).

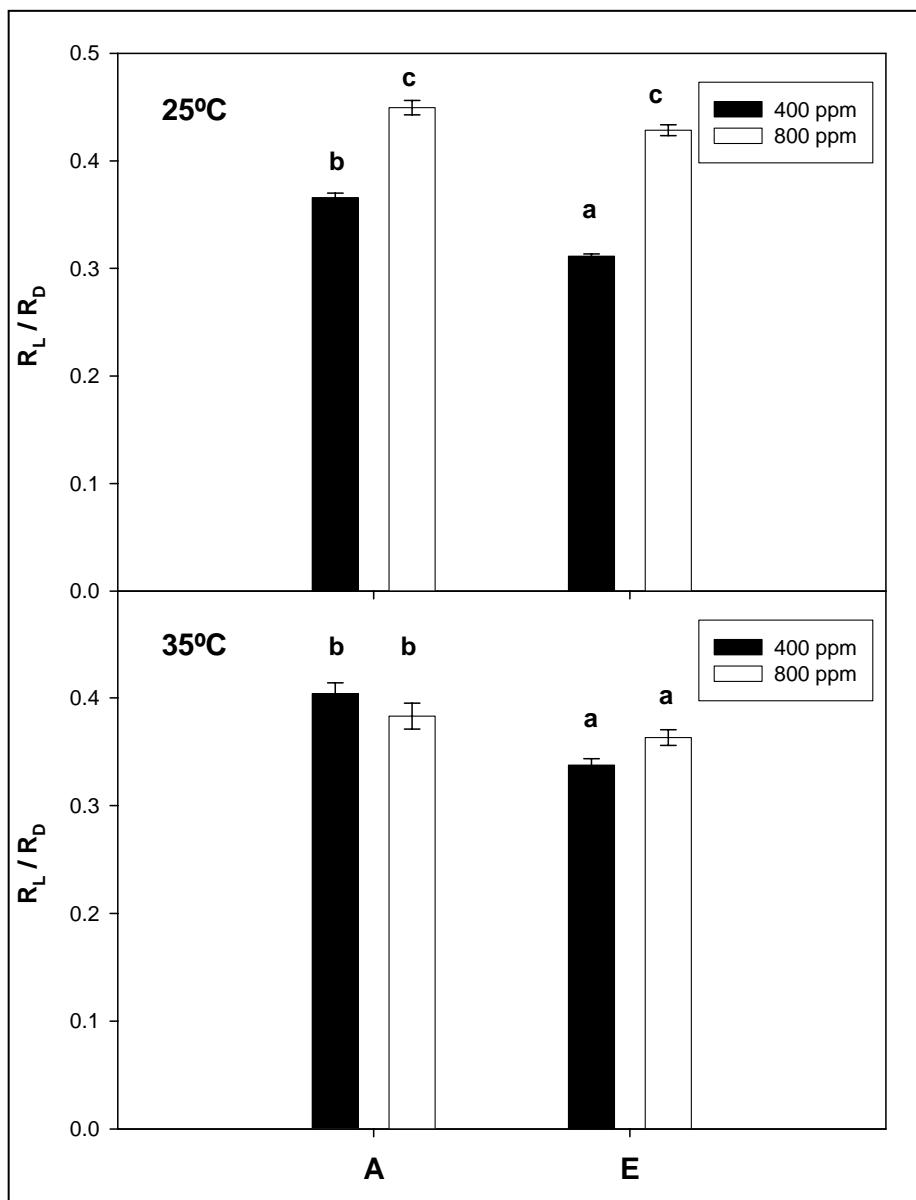
A la figura 4.2.12 es poden observar les corbes de resposta a la llum de l'assimilació neta de  $\text{CO}_2$  de la capçada, a partir de les quals es va realitzar l'estimació de la taxa de respiració mitocondrial a la llum ( $R_L$ ) a *Cycas revoluta*.

La taxa de respiració a la llum a *Cycas revoluta* va ser molt baixa. Amb independència de les condicions ambientals de mesura, l'exposició continuada a  $\text{CO}_2$  elevat durant el creixement va reduir de manera important la taxa de respiració a la llum (Fig. 4.1.13). No obstant això, el  $\text{CO}_2$  elevat també va produir un estímul de la  $R_L$  per efecte directe, encara que només a 25°C. D'altra banda, les taxes  $R_L$  obtingudes a 35°C van ser significativament superiors a les mesurades a 25°C (Fig. 4.2.13).



**Figura 4.2.13.** Efectes del CO<sub>2</sub> i la temperatura sobre la taxa de respiració mitocondrial a la llum ( $R_L$ ) de la capçada a *Cycas revoluta* (n=3).

A 25°C es va donar un increment al quocient  $R_L / R_D$  quan la concentració de  $CO_2$  de l'aire va ser de 800 ppm que no es va observar a 35°C. Per tant, a 25°C el percentatge de respiració activa a la llum es va incrementar per efecte directe del  $CO_2$  (Fig. 4.2.14). Tot i que es va produir alguna interacció significativa amb el  $CO_2$  de mesura, el  $CO_2$  de creixement va produir de manera general una reducció en la proporció de respiració activa en presència de llum.



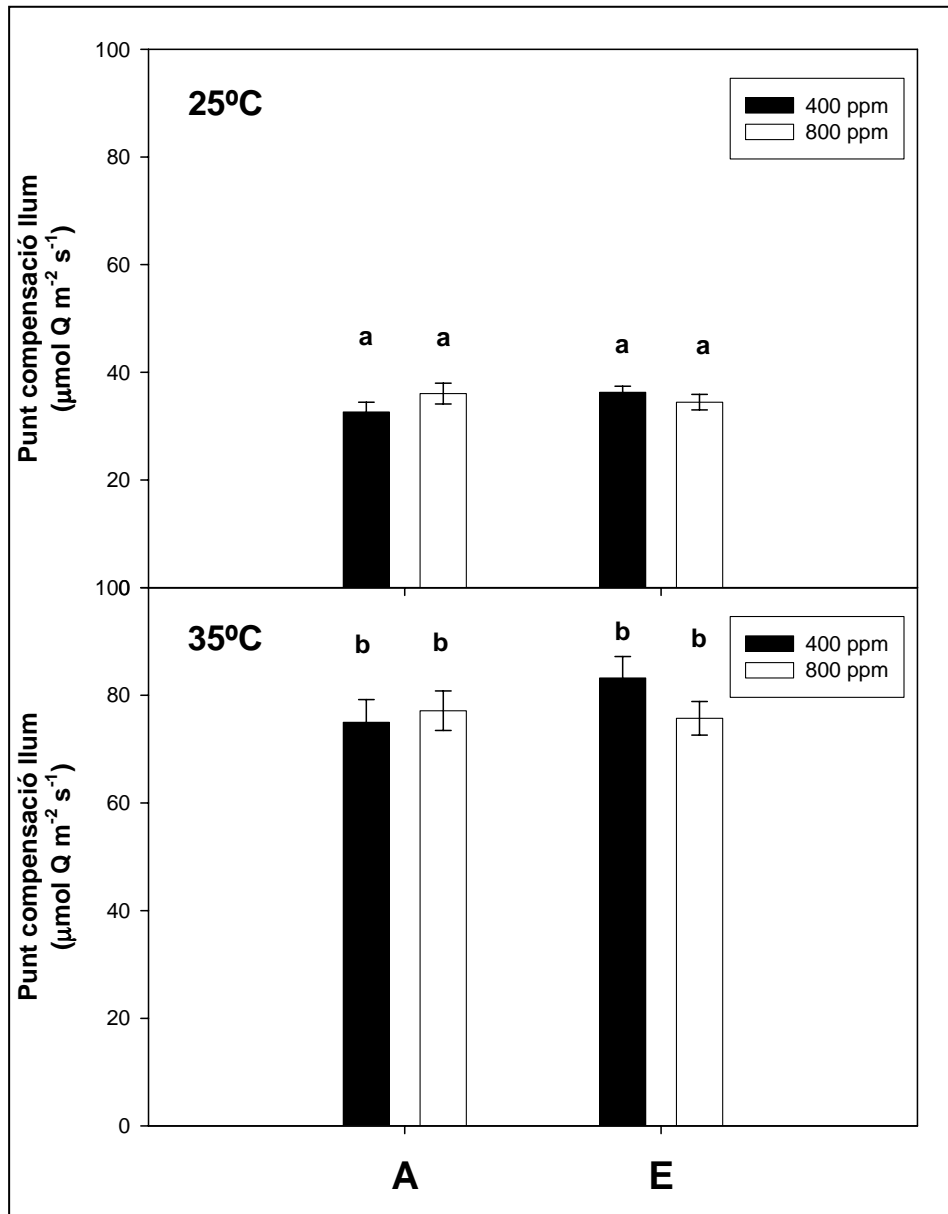
**Figura 4.2.14.** Efectes del  $CO_2$  i la temperatura sobre el quocient  $R_L / R_D$  a *Cycas revoluta* (n=3).

#### 4. 2. 1. 4. PUNTS DE COMPENSACIÓ DE LA CAPÇADA

Mitjançant les cambres de bescanvi gasós, es van caracteritzar els punts de compensació de la capçada: el punt de compensació lumínic, el punt de compensació de CO<sub>2</sub> i el punt de compensació tèrmic.

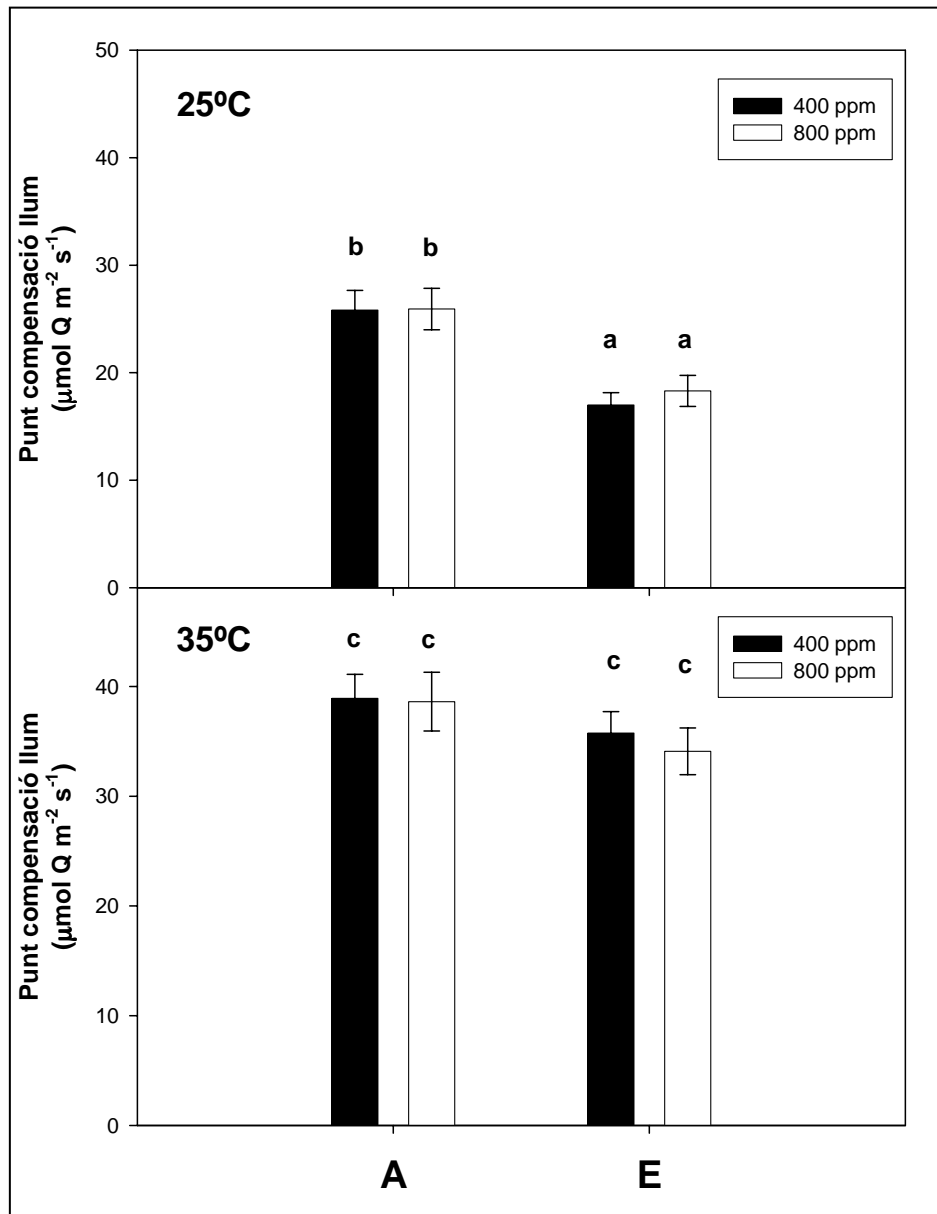
El punt de compensació lumínic de la capçada es va obtenir a partir de les corbes de resposta a la llum de l'assimilació neta de CO<sub>2</sub> mostrades a l'apartat anterior (4.2.1.3). Es tracta de la intensitat de llum necessària perquè la fotosíntesi compensés els processos respiratoris.

A *Chamaerops humilis*, el punt de compensació de llum no es va veure afectat pel CO<sub>2</sub>, ni de manera immediata ni a llarg termini. Únicament es va veure influenciat per la temperatura. Així, el punt de compensació lumínic obtingut a 35°C va ser molt superior al mesurat a 25°C (Fig. 4.2.15).

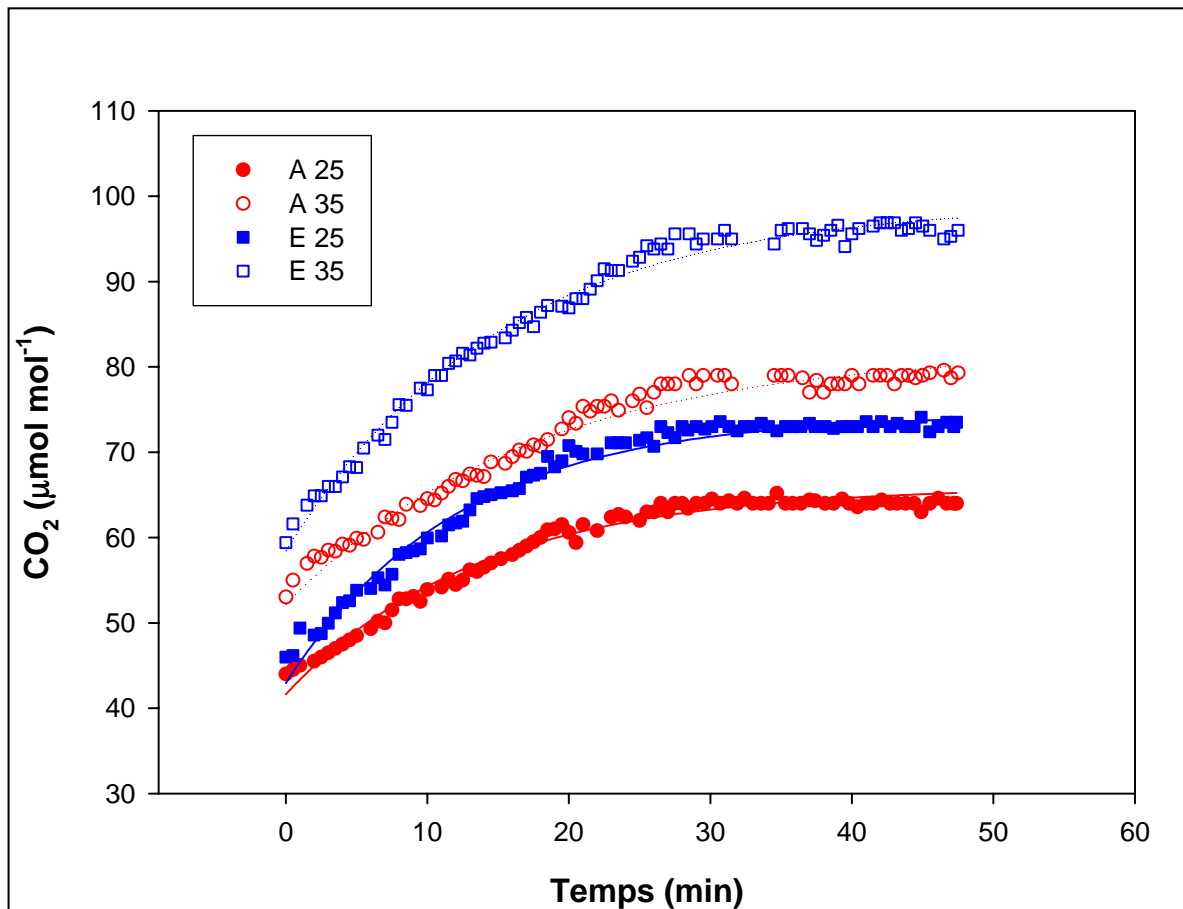


**Figura 4.2.15.** Efectes del CO<sub>2</sub> i la temperatura sobre el punt de compensació lumínica de la capçada a *Chamaerops humilis* (n=4).

A *Cycas revoluta*, el creixement a CO<sub>2</sub> elevat durant 20 mesos va reduir el punt de compensació lumínic a 25°C, mentre que a 35°C no es va observar cap efecte. D'altra banda, una exposició instantània a CO<sub>2</sub> elevat no va produir efecte en cap cas. En aquesta espècie, el punt de compensació també va augmentar significativament en incrementar la temperatura (Fig. 4.2.16).



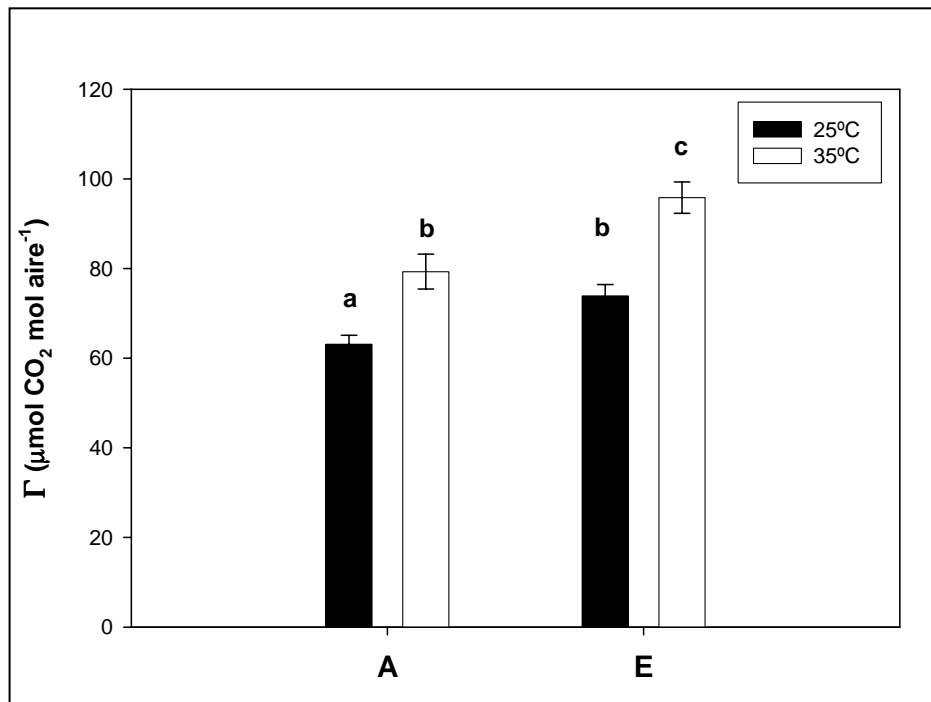
**Figura 4.2.16.** Efectes del CO<sub>2</sub> i la temperatura sobre el punt de compensació lumínic de la capçada a *Cycas revoluta* (n=4).



**Figura 4.2.17.** Evolució temporal de la concentració de CO<sub>2</sub> de l'aire en un sistema tancat amb plantes de *Chamaerops humilis* al seu interior. La concentració final, estable en el temps, correspon al punt de compensació de CO<sub>2</sub> ( $\Gamma$ ) de la capçada.

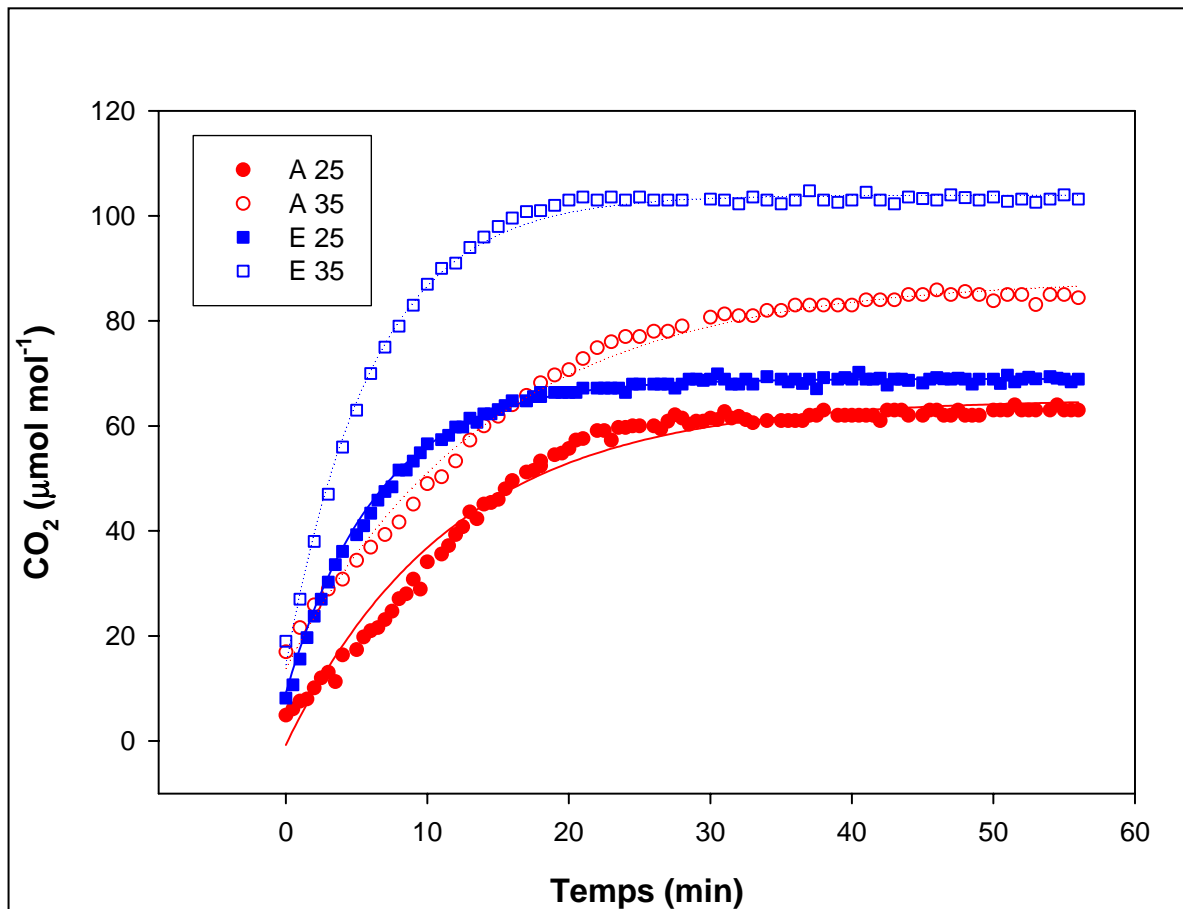
Les figures 4.2.17 i 4.2.19 mostren, respectivament, les corbes d'exemple del procés d'obtenció del punt de compensació de CO<sub>2</sub> ( $\Gamma$ ) a *Chamaerops humilis* i *Cycas revoluta*.

Les plantes de *Chamaerops*, introduïdes en un sistema tancat on prèviament s'havia disminuït la concentració de CO<sub>2</sub>, van arribar a un equilibri entre el consum de CO<sub>2</sub> per fotosíntesi i l'emissió de CO<sub>2</sub> pels processos respiratoris en menys de 30 minuts (Fig. 4.2.17). Les plantes aclimatades a CO<sub>2</sub> elevat (E) van evidenciar un punt de compensació de CO<sub>2</sub> de la capçada significativament més alt que les plantes A. El  $\Gamma$  també va augmentar clarament en resposta a un increment de temperatura (Fig. 4.2.18).



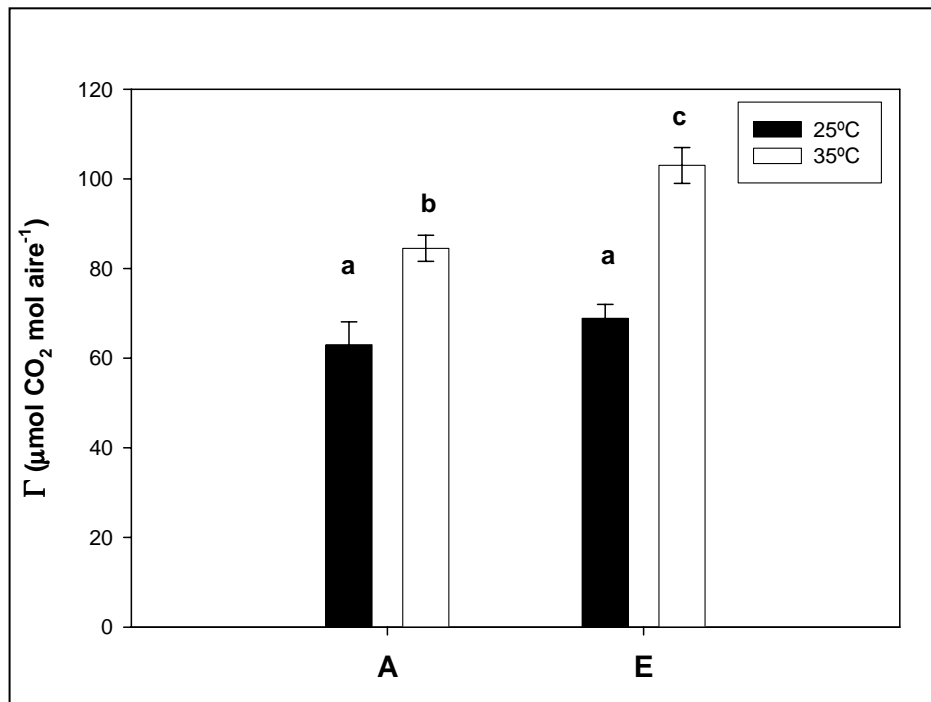
**Figura 4.2.18.** Efectes del CO<sub>2</sub> i la temperatura sobre el punt de compensació de CO<sub>2</sub> de la capçada a *Chamaerops humilis* (n=3).



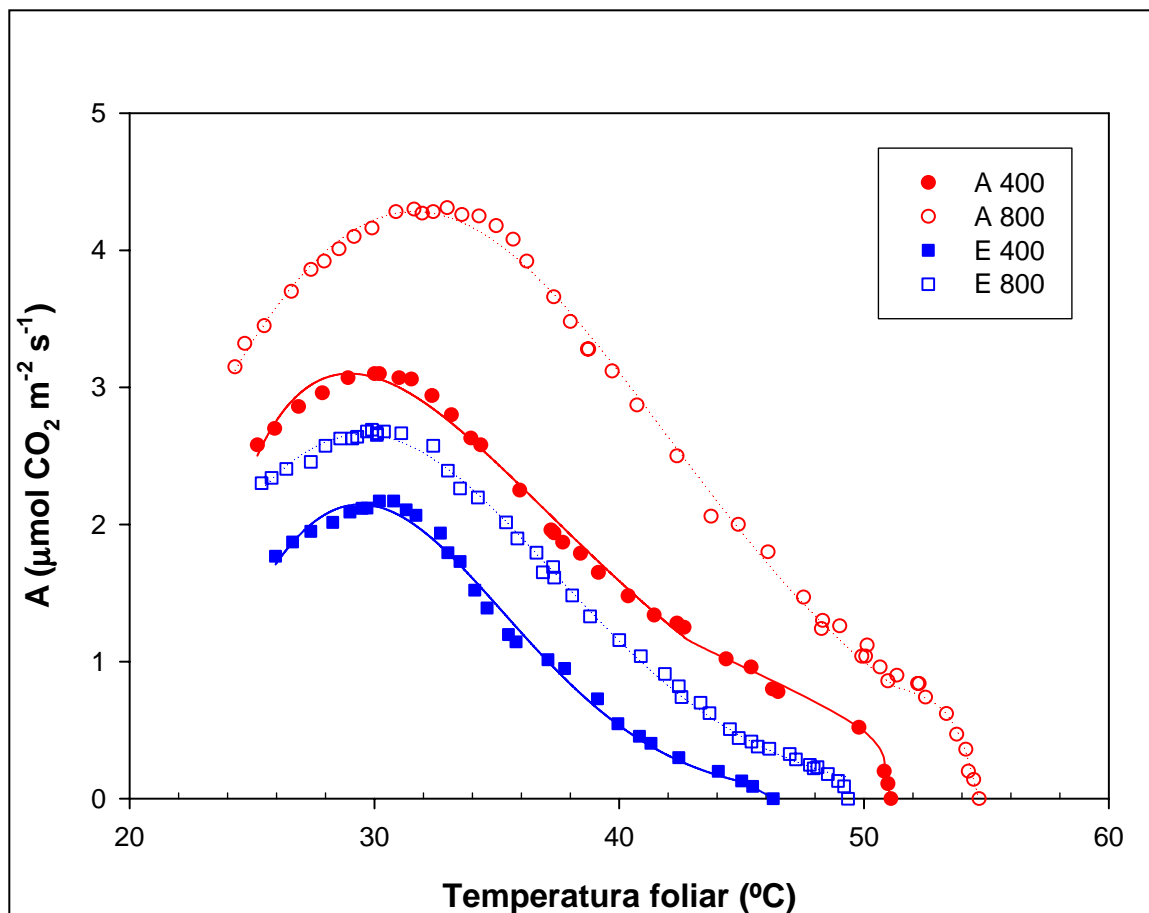


**Figura 4.2.19.** Evolució temporal de la concentració de CO<sub>2</sub> de l'aire en un sistema tancat amb plantes de *Cycas revoluta* al seu interior. La concentració final, estable en el temps, correspon al punt de compensació de CO<sub>2</sub> (Γ) de la capçada.

A *Cycas revoluta*, el punt de compensació de CO<sub>2</sub> de la capçada no es va veure afectat pel CO<sub>2</sub> de creixement quan la temperatura va ser de 25°C. Per contra, a 35°C sí que es van donar diferències entre tractaments. A temperatura elevada, les plantes aclimatades a alt CO<sub>2</sub> (E) van mostrar un punt de compensació de CO<sub>2</sub> superior al de les crescudes a CO<sub>2</sub> ambiental. Finalment, es va tornar a observar un marcat efecte de la temperatura, que va elevar el punt de compensació de CO<sub>2</sub> (Fig. 4.2.20).



**Figura 4.2.20.** Efectes del  $\text{CO}_2$  i la temperatura sobre el punt de compensació de  $\text{CO}_2$  de la capçada a *Cycas revoluta* (n=3).

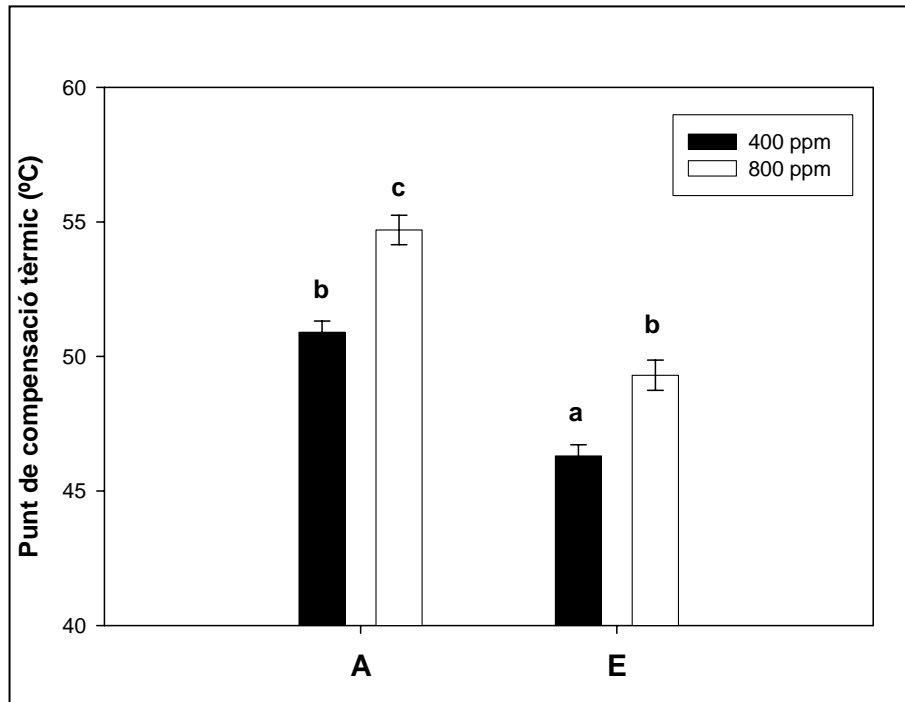


**Figura 4.2.21.** Corbes de resposta de l'assimilació neta de CO<sub>2</sub> de la capçada a la temperatura a *Chamaerops humilis*, a partir de les quals s'ha obtingut el punt de compensació tèrmic.

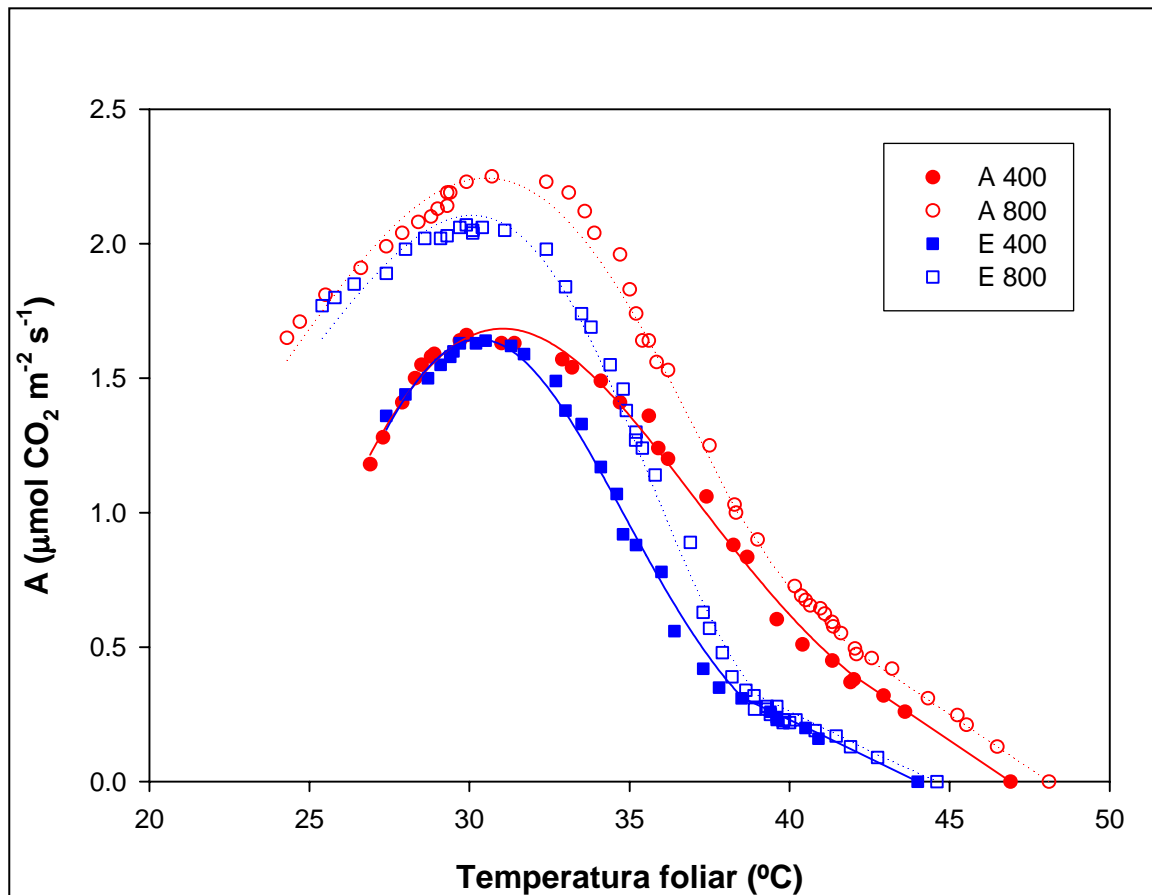
Les corbes de resposta fotosintètica a la temperatura obtingudes a *Chamaerops humilis* van presentar una forma acampanada, similar a tots els tractaments (Fig. 4.2.21). Així, a la regió inicial es va donar un increment de l'assimilació neta de CO<sub>2</sub> en augmentar la temperatura fins arribar a un màxim, per sobre del qual la fotosíntesi neta va començar a disminuir. La temperatura en què l'assimilació neta de CO<sub>2</sub> va esdevenir nul·la representa el punt de compensació tèrmic. Tot i presentar similituds en la forma, les diferències entre tractaments van ser clares, sobretot pel que fa a les taxes absolutes de fotosíntesi neta. També es va observar un òptim tèrmic superior quan les mesures es van realitzar a 800 ppm de CO<sub>2</sub> (Fig. 4.2.21).

El CO<sub>2</sub> elevat va presentar un fort efecte sobre el punt de compensació tèrmic de *Chamaerops humilis* (Fig. 4.2.22). D'aquesta manera, a les plantes crescudes a elevat CO<sub>2</sub>, la compensació

fotosintètica es va produir a una temperatura inferior que a les plantes crescudes a CO<sub>2</sub> ambiental. No obstant, l'efecte directe del CO<sub>2</sub> va ser contrari, ja que quan la concentració de CO<sub>2</sub> del aire era elevada (800 ppm) el punt de compensació es va assolir a una temperatura més alta (Fig. 4.2.22).



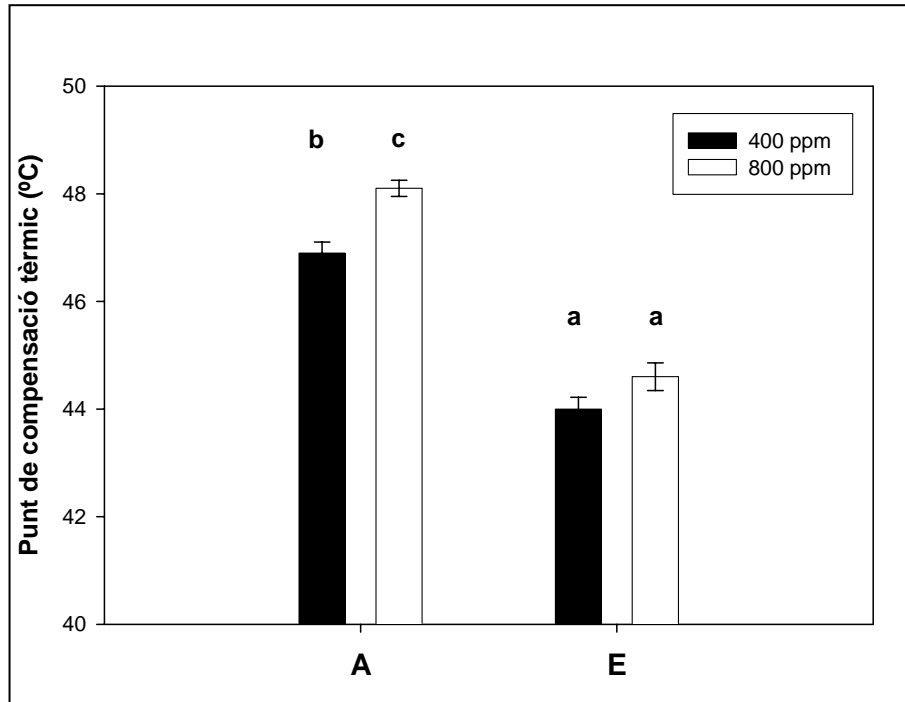
**Figura 4.2.22.** Efecte directe i indirecte del CO<sub>2</sub> sobre el punt de compensació tèrmic de la capçada a *Chamaerops humilis* (n=3).



**Figura 4.2.23.** Corbes de resposta de l'assimilació neta de  $\text{CO}_2$  de la capçada a la temperatura a *Cycas revoluta*, a partir de les quals s'ha obtingut el punt de compensació tèrmic.

La cinètica de les corbes de resposta de la fotosíntesi neta a la temperatura obtingudes a *Cycas revoluta* també va presentar la característica forma acampanada (Fig. 4.2.23). A temperatures inferiors a  $30^{\circ}\text{C}$ , les plantes A i E es van comportar de manera semblant. En aquesta zona, es van produir diferències importants a causa de l'efecte directe estimulador del  $\text{CO}_2$  elevat sobre la fotosíntesi. Per això, l'òptim tèrmic de la fotosíntesi va ser superior a 800 ppm. A partir dels  $30^{\circ}\text{C}$ , la resposta entre tractaments (A i E) es va començar a diferenciar, mostrant les plantes E més sensibilitat a l'augment de temperatura, alhora que la concentració atmosfèrica de  $\text{CO}_2$  (400 i 800 ppm) va anar reduint el seu efecte (Fig. 4.2.23).

El punt de compensació tèrmic es va veure reduït per efecte indirecte del CO<sub>2</sub> (Fig. 4.2.24). En aquesta espècie, l'efecte directe del CO<sub>2</sub> només es va donar a les plantes A, les quals van tenir un punt de compensació tèrmic més alt a 800 que a 400 ppm de CO<sub>2</sub>.



**Figura 4.2.24.** Efecte directe i indirecte del CO<sub>2</sub> sobre el punt de compensació tèrmic de la capçada a *Cycas revoluta* (n=3).

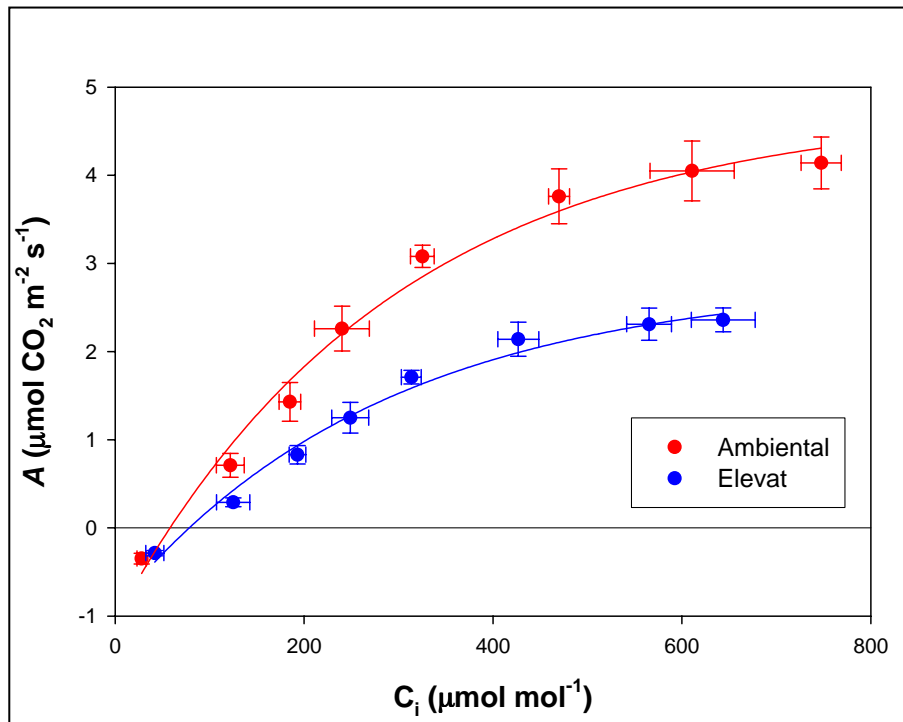
4. 2. 2. ASSIMILACIÓ DE CO<sub>2</sub> I FLUORESCÈNCIA DE LES CLOROFIL·LES FOLIAR

Figura 4.2.25. Corbes de resposta al CO<sub>2</sub> de l'assimilació neta de CO<sub>2</sub> ( $A/c_i$ ) a *Chamaerops humilis* (n=6).

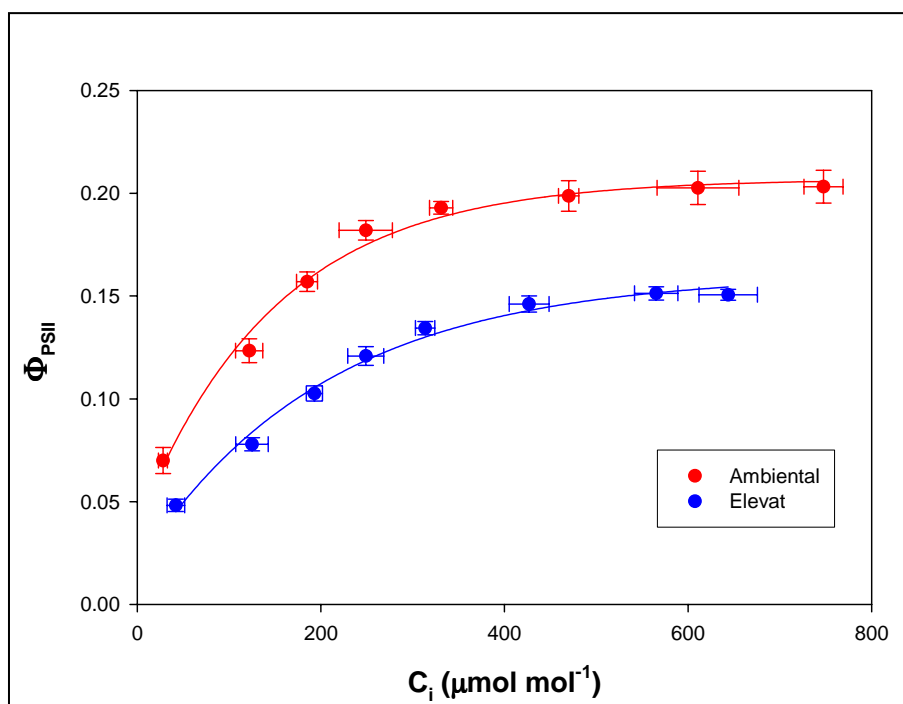


Figura 4.2.26. Corbes de resposta al CO<sub>2</sub> del rendiment quàntic relatiu del fotosistema II ( $\Phi_{\text{PSII}}/c_i$ ) a *Chamaerops humilis* (n=6).

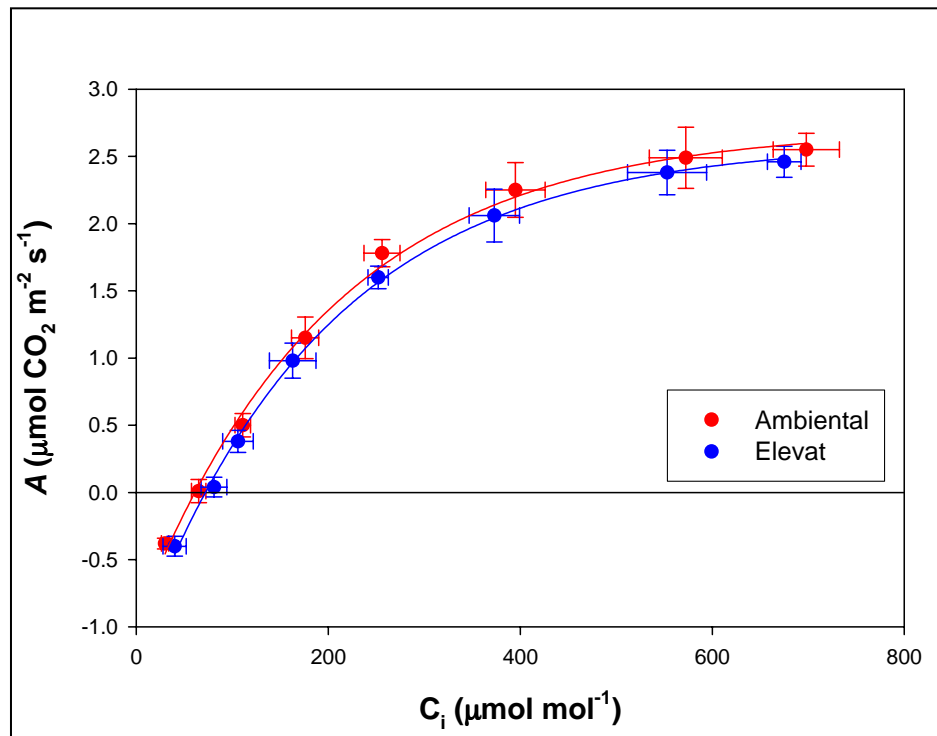
A *Chamaerops humilis*, la taxa de fotosíntesi neta va incrementar de manera exponencial en resposta a l'augment progressiu de la concentració de CO<sub>2</sub> intercel·lular ( $c_i$ ), produint-se una saturació als últims punts mesurats. Es pot observar com la corba obtinguda a les plantes E va presentar taxes de fotosíntesi inferiors als de les plantes A (Fig. 4.2.25). La resposta general del rendiment quàntic relatiu del fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ) va ser similar, amb valors més baixos a les plantes aclimatades a CO<sub>2</sub> elevat (Fig. 4.2.26).

L'anàlisi de les corbes  $A/c_i$  va posar de manifest una reducció tant al pendent inicial de la corba com a la fase de saturació a les plantes crescudes a alt CO<sub>2</sub> (Taula 4.2.5). Així, el CO<sub>2</sub> elevat va disminuir la velocitat màxima de carboxilació de la Rubisco ( $V_{c,max}$ ), el màxim transport electrònic potencial que contribueix la regeneració de la RuBP ( $J_{max}$ ), la capacitat fotosintètica ( $A_{sat}$ ) i la taxa màxima de fotosíntesi amb CO<sub>2</sub> i llum saturants ( $A_{max}$ ). Cal esmentar que aquests paràmetres han presentat uns valors extremadament baixos, inclús en el cas de les plantes A, essent dels valors més baixos descrits en plantes superiors. D'altra banda, les plantes E van presentar una limitació estomàtica ( $l$ ) i un punt de compensació de CO<sub>2</sub> ( $\Gamma$ ) superiors al de les plantes A. No es van observar diferències quant al rendiment quàntic màxim del PSII ( $F_v / F_m$ ).

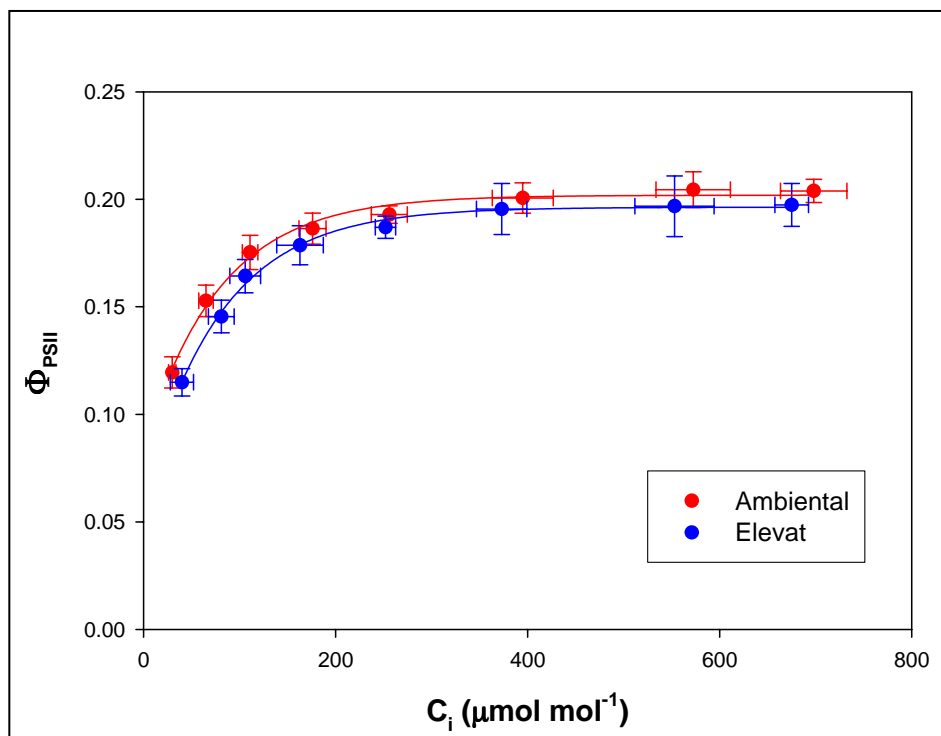
**Taula 4.2.5.** Resum dels principals paràmetres resultants de l'anàlisi de les corbes  $A/c_i$  i  $F_v / F_m$  a *Chamaerops humilis* (n=6).  $A_{sat}$ : capacitat fotosintètica o taxa màxima d'assimilació neta de CO<sub>2</sub> amb llum saturant a CO<sub>2</sub> ambiental ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );  $A_{max}$ : taxa màxima de d'assimilació neta de CO<sub>2</sub> neta amb llum i CO<sub>2</sub> saturants ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );  $V_{c,max}$ : velocitat màxima de carboxilació o activitat *in vivo* de la Rubisco ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );  $J_{max}$ : transport electrònic màxim potencial ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );  $l$ : limitació estomàtica (%);  $\Gamma$ : punt de compensació de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ );  $F_v / F_m$ : rendiment quàntic màxim del PSII.

Paràmetre	A		E	
$A_{sat}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	3.12 ± 0.13	b	1.52 ± 0.08	a
$A_{max}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	4.81 ± 0.29	b	2.59 ± 0.14	a
$V_{c,max}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	14.3 ± 1.1	b	8.5 ± 1.0	a
$J_{max}$ ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	31.5 ± 2.2	b	20.2 ± 2.0	a
$l$ (%)	19.1 ± 2.2	a	28.3 ± 3.7	b
$\Gamma$ ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )	58.7 ± 3.1	a	77.4 ± 4.3	b
$F_v / F_m$	0.79 ± 0.03	a	0.77 ± 0.04	a





**Figura 4.2.27.** Corbes de resposta al CO<sub>2</sub> de l'assimilació neta de CO<sub>2</sub> ( $A/c_i$ ) a *Cycas revoluta* (n=6).



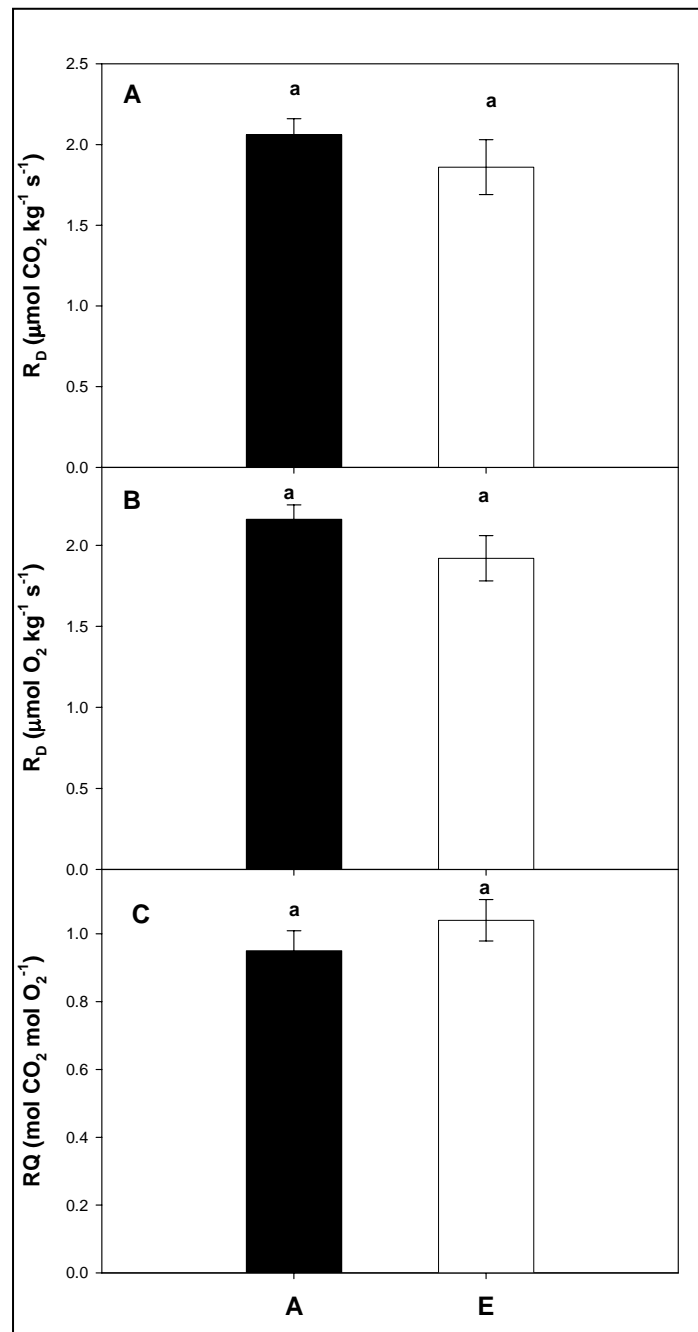
**Figura 4.2.28.** Corbes de resposta al CO<sub>2</sub> del rendiment quàntic relatiu del fotosistema II ( $\Phi_{\text{PsII}}/c_i$ ) a *Cycas revoluta* (n=6).

A *Cycas revoluta*, les corbes de resposta de l'assimilació de CO<sub>2</sub> i el rendiment quàntic relatiu del PSII a les variacions de la concentració intercel·lular de CO<sub>2</sub> (c<sub>i</sub>) van ser iguals entre tractaments (Fig. 4.2.27 i 4.2.28). A conseqüència d'això, no es van donar diferències a la V<sub>c,max</sub>, J<sub>max</sub>, A<sub>sat</sub> i A<sub>max</sub>. A més, igual que a *Chamaerops humilis*, tots aquests paràmetres van presentar valors molt inferiors als habituals en la major part d'espècies vegetals. La limitació estomàtica, el punt de compensació de CO<sub>2</sub> i el rendiment quàntic màxim tampoc es van veure afectats per l'exposició durant 20 mesos a CO<sub>2</sub> elevat. (Taula 4.2.6).

**Taula 4.2.6.** Resum dels principals paràmetres resultants de l'anàlisi de les corbes A/c<sub>i</sub> i F<sub>v</sub> / F<sub>m</sub> a *Cycas revoluta* (n=6).

Paràmetre	A		E	
A <sub>sat</sub> (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	1.33 ± 0.10	a	1.44 ± 0.08	a
A <sub>max</sub> (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	2.60 ± 0.12	a	2.44 ± 0.12	a
V <sub>c,max</sub> (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	11.6 ± 0.5	a	11.8 ± 0.5	a
J <sub>max</sub> (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	24.3 ± 1.0	a	24.6 ± 1.0	a
l (%)	28.4 ± 3.3	a	28.0 ± 2.3	a
Γ (μmol mol <sup>-1</sup> )	71.1 ± 4.2	a	72.8 ± 5.6	a
F <sub>v</sub> / F <sub>m</sub>	0.79 ± 0.02	a	0.79 ± 0.03	a

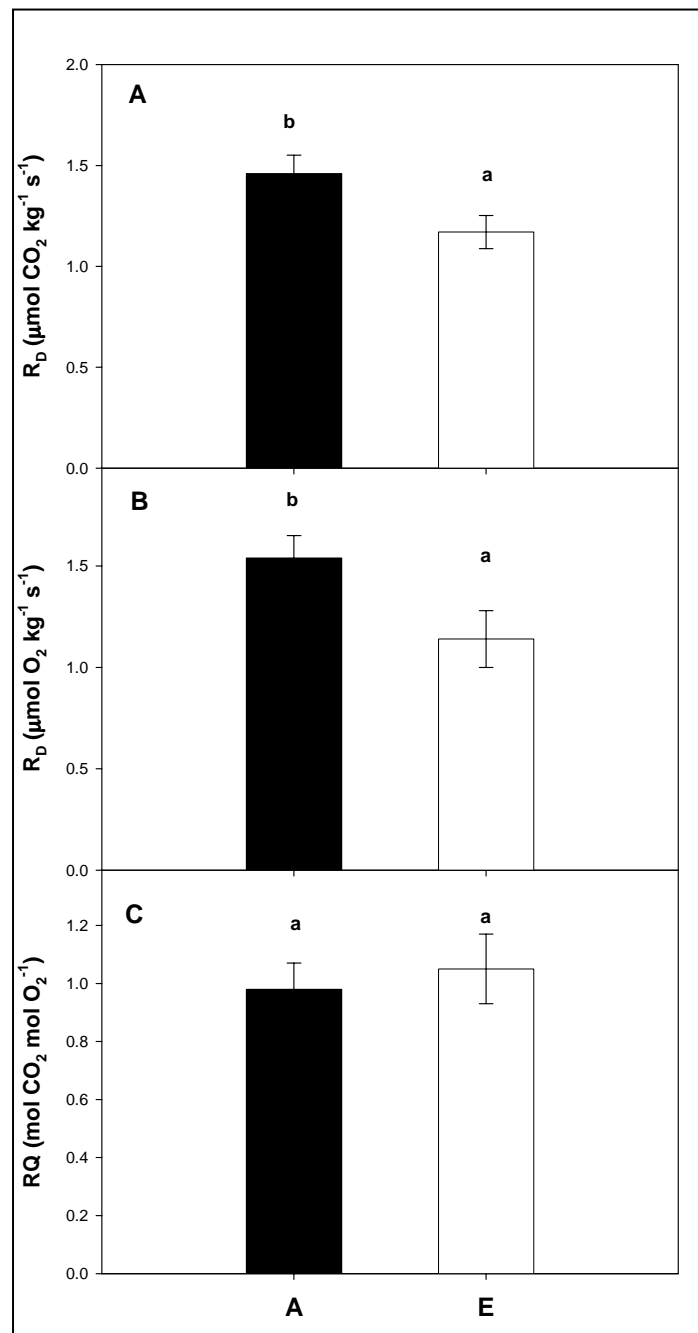
## 4. 2. 3. DETERMINACIÓ DE LA TAXA DE RESPIRACIÓ MITOCONDRIAL



**Figura 4.2.29.** Efecte indirecte o a llarg termini del CO<sub>2</sub> elevat sobre (A) la taxa de respiració per producció de CO<sub>2</sub> (μmol CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>), (B) per consum d'oxigen (μmol O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) i (C) sobre el quocient respiratori a *Chamaerops humilis* (n=8).

A *Chamaerops humilis*, la taxa de respiració de fosc de les plantes crescudes a alt CO<sub>2</sub> va ser lleugerament inferior a l'obtinguda a les plantes A. No obstant això, en cap cas hi va haver diferències significatives entre tractaments, tant a les mesures realitzades amb el Li-Cor 6400 (Fig. 4.2.29A) com a les de l'elèctrode de Clark (Fig. 4.2.29B). Les taxes d'emissió de CO<sub>2</sub> i de consum d'O<sub>2</sub> van ser semblants, per la qual cosa el quocient respiratori (RQ) va ser proper a 1, tant a les plantes A com a les crescudes sota CO<sub>2</sub> elevat (Fig. 4.2.29C).

A *Cycas revoluta*, la reducció de respiració per efecte del CO<sub>2</sub> elevat va ser més important. Així, la producció de CO<sub>2</sub> va disminuir un 20%, mentre que el consum d'oxigen un 26%, essent la respiració en ambdós casos significativament inferior a les plantes cultivades a alt CO<sub>2</sub> (Fig. 4.2.30A i B). Es va obtenir un valor de RQ al voltant de 1, sense diferències entre tractaments (Fig. 4.2.30C).



**Figura 4.2.30.** Efecte indirecte o a llarg termini del CO<sub>2</sub> elevat sobre (A) la taxa de respiració per producció de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), (B) per consum d'oxigen ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) i (C) sobre el quocient respiratori a *Cycas revoluta* (n=8).

## 4. 2. 4. CONTINGUT DE CARBONI I NITROGEN

*Chamaerops humilis* va presentar un contingut en carboni elevat, especialment a les fulles (Taula 4.2.7). L'exposició a CO<sub>2</sub> elevat va incrementar el percentatge de carboni. Així, als 5 mesos el contingut en carboni va ser superior per efecte del CO<sub>2</sub> elevat a tiges i arrels, mentre que als 20 mesos totes les fraccions de la planta van presentar un contingut de carboni superior en resposta al CO<sub>2</sub> elevat (Taula 4.2.7).

El contingut en nitrogen també es va veure alterat pel CO<sub>2</sub> elevat. Als 5 mesos, les arrels van experimentar una disminució significativa del contingut de nitrogen (Taula 4.2.8). Al final de l'experiment, la reducció es va accentuar i va afectar a tots els òrgans analitzats.

En general, la relació C/N va ser bastant elevada, a causa d'un alt contingut en carboni i uns nivells molt baixos de nitrogen. Aquest quocient va incrementar per efecte del CO<sub>2</sub> elevat a les arrels als 5 mesos i a totes les fraccions després de 20 mesos (Taula 4.2.9).

**Taula 4.2.7.** Contingut de carboni (%) als diferents òrgans de *Chamaerops humilis* (fulles, tiges i arrels) a al llarg de l'exposició a CO<sub>2</sub> elevat (inici, 5 i 20 mesos) (n=6).

Fracció	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>		P <sub>F</sub>	
	punt inicial	5 mesos		20 mesos	
		A	E	A	E
<b>Fulles</b>	48.0 ± 0.1	47.6 ± 0.2 a	47.8 ± 0.1 a	47.7 ± 0.2 a	49.6 ± 0.1 b
<b>Tiges</b>	45.1 ± 0.1	44.7 ± 0.1 a	45.4 ± 0.1 b	45.2 ± 0.2 a	47.5 ± 0.1 b
<b>Arrels</b>	44.1 ± 0.1	44.2 ± 0.1 a	44.5 ± 0.0 b	44.1 ± 0.3 a	45.3 ± 0.1 b

**Taula 4.2.8.** Contingut de nitrogen (%) als diferents òrgans de *Chamaerops humilis* (fulles, tiges i arrels) a al llarg de l'exposició a CO<sub>2</sub> elevat (inici, 5 i 20 mesos) (n=6).

Fracció	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>		P <sub>F</sub>	
	punt inicial	5 mesos		20 mesos	
		A	E	A	E
<b>Fulles</b>	1.81 ± 0.04	1.26 ± 0.03 a	1.17 ± 0.03 a	1.29 ± 0.08 b	1.00 ± 0.02 a
<b>Tiges</b>	1.45 ± 0.05	1.06 ± 0.03 a	1.03 ± 0.05 a	1.65 ± 0.14 b	1.21 ± 0.11 a
<b>Arrels</b>	1.74 ± 0.04	1.51 ± 0.03 b	1.40 ± 0.02 a	1.74 ± 0.14 b	1.26 ± 0.06 a

**Taula 4.2.9.** Relació entre carboni i nitrogen (C/N) als diferents òrgans de *Chamaerops humilis* (fulles, tiges i arrels) a al llarg de l'exposició a CO<sub>2</sub> elevat (inici, 5 i 20 mesos) (n=6).

Fracció	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>		P <sub>F</sub>	
	punt inicial	5 mesos		20 mesos	
		A	E	A	E
<b>Fulles</b>	26.6 ± 0.6	38.0 ± 0.9 a	41.0 ± 1.0 a	37.9 ± 3.1 a	49.8 ± 1.2 b
<b>Tiges</b>	31.2 ± 1.2	42.4 ± 1.1 a	44.2 ± 1.9 a	29.1 ± 2.6 a	41.0 ± 3.8 b
<b>Arrels</b>	25.4 ± 0.5	29.2 ± 0.6 a	31.7 ± 0.5 b	26.4 ± 2.4 a	35.3 ± 1.3 b

El contingut de carboni de *Cycas revoluta* només es va veure afectat pel CO<sub>2</sub> al mostreig dels 20 mesos. En aquest punt, a les fulles i al tronc el %C va ser superior en plantes E (Taula 4.2.10).

Pel que fa al nitrogen, es pot observar com l'òrgan amb un contingut més elevat són les arrels gruixudes (Taula 4.2.11). Als 5 mesos no es va donar cap diferència entre tractaments al %N de cap òrgan. Per contra, al P<sub>F</sub> el CO<sub>2</sub> elevat va provocar una important reducció de nitrogen a totes les fraccions analitzades.

De la mateixa manera que el carboni i el nitrogen, la relació C/N no va variar al P<sub>1</sub>, però sí que va fer-ho als 20 mesos a tots els òrgans estudiats. Així, en aquest punt, el CO<sub>2</sub> elevat va incrementar significativament aquest paràmetre a les fulles, tronc, arrels gruixudes i arrels fines (Taula 4.2.12).

**Taula 4.2.10.** Contingut de carboni (%) als diferents òrgans de *Cycas revoluta* (fulles noves, fulles velles, tronc, arrels gruixudes i arrels fines) a al llarg de l'exposició a CO<sub>2</sub> elevat (inici, 5 i 20 mesos) (n=6).

Fracció	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>		P <sub>F</sub>	
	punt inicial	5 mesos		20 mesos	
		A	E	A	E
<b>Fulles N</b>	nd	46.7 ± 0.5 a	46.7 ± 0.3 a	nd	nd
<b>Fulles V</b>	47.1 ± 0.2	45.8 ± 0.2 a	46.4 ± 0.3 a	45.3 ± 0.5 a	47.6 ± 0.2 b
<b>Tronc</b>	41.2 ± 0.1	41.1 ± 0.4 a	41.8 ± 0.2 a	44.3 ± 0.3 a	45.6 ± 0.2 b
<b>Arrels G</b>	44.1 ± 0.2	44.8 ± 0.3 a	45.5 ± 0.1 a	44.1 ± 0.6 a	44.7 ± 0.6 a
<b>Arrels F</b>	42.6 ± 0.3	42.9 ± 0.1 a	43.2 ± 0.1 a	45.5 ± 0.2 a	45.7 ± 0.2 a

**Taula 4.2.11.** Contingut de nitrogen (%) als diferents òrgans de *Cycas revoluta* (fulles noves, fulles velles, tronc, arrels gruixudes i arrels fines) a al llarg de l'exposició a CO<sub>2</sub> elevat (inici, 5 i 20 mesos) (n=6).

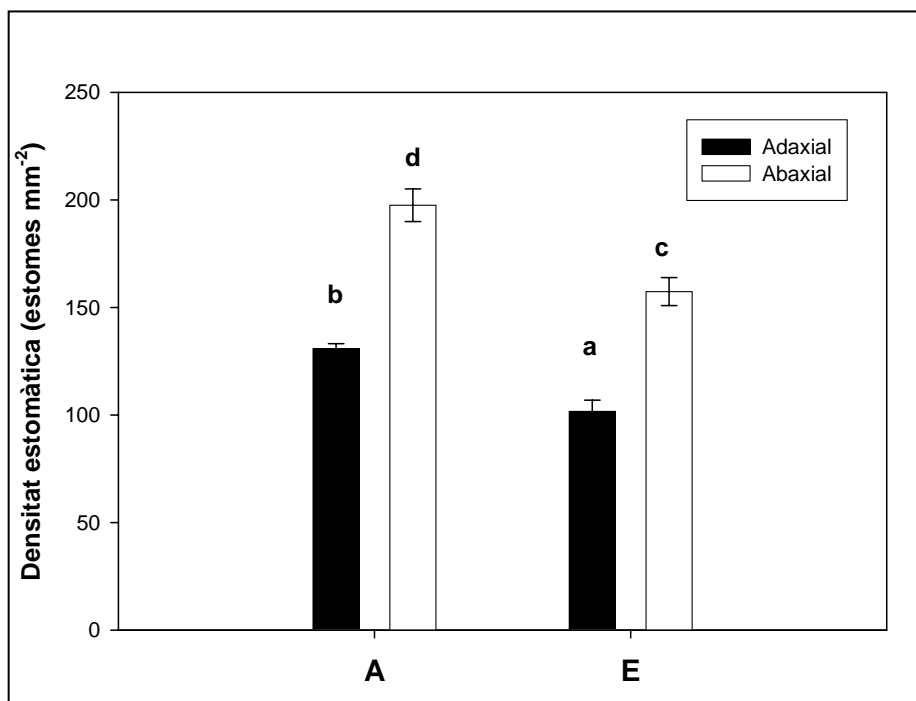
Fracció	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>		P <sub>F</sub>	
	punt inicial	5 mesos		20 mesos	
		A	E	A	E
<b>Fulles N</b>	nd	2.81 ± 0.22 a	2.38 ± 0.12 a	nd	nd
<b>Fulles V</b>	2.34 ± 0.23	2.34 ± 0.03 a	2.33 ± 0.10 a	2.55 ± 0.17 b	1.80 ± 0.12 a
<b>Tronc</b>	1.10 ± 0.03	1.33 ± 0.07 a	1.31 ± 0.04 a	3.03 ± 0.25 b	1.53 ± 0.07 a
<b>Arrels G</b>	3.30 ± 0.08	3.65 ± 0.15 a	3.69 ± 0.08 a	3.59 ± 0.07 b	3.31 ± 0.06 a
<b>Arrels F</b>	1.47 ± 0.07	1.92 ± 0.11 a	2.05 ± 0.15 a	3.61 ± 0.22 b	1.99 ± 0.17 a

**Taula 4.2.12.** Relació C/N als diferents òrgans de *Cycas revoluta* (fulles noves, fulles velles, tronc, arrels gruixudes i arrels fines) a al llarg de l'exposició a CO<sub>2</sub> elevat (inici, 5 i 20 mesos) (n=6).

Fracció	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>		P <sub>F</sub>	
	punt inicial	5 mesos		20 mesos	
		A	E	A	E
<b>Fulles N</b>	nd	16.9 ± 1.5 a	19.7 ± 1.0 a	nd	nd
<b>Fulles V</b>	20.7 ± 1.9	19.6 ± 0.3 a	20.0 ± 1.0 a	18.2 ± 1.4 a	27.0 ± 1.7 b
<b>Tronc</b>	37.5 ± 1.1	31.1 ± 1.7 a	31.9 ± 1.0 a	15.2 ± 1.4 a	30.1 ± 1.5 b
<b>Arrels G</b>	13.4 ± 0.3	12.3 ± 0.4 a	12.3 ± 0.3 a	12.3 ± 0.2 a	13.5 ± 0.3 b
<b>Arrels F</b>	29.2 ± 1.3	22.6 ± 1.4 a	21.2 ± 1.4 a	12.8 ± 0.8 a	23.6 ± 1.6 b

#### 4. 2. 5. DENSITAT ESTOMÀTICA

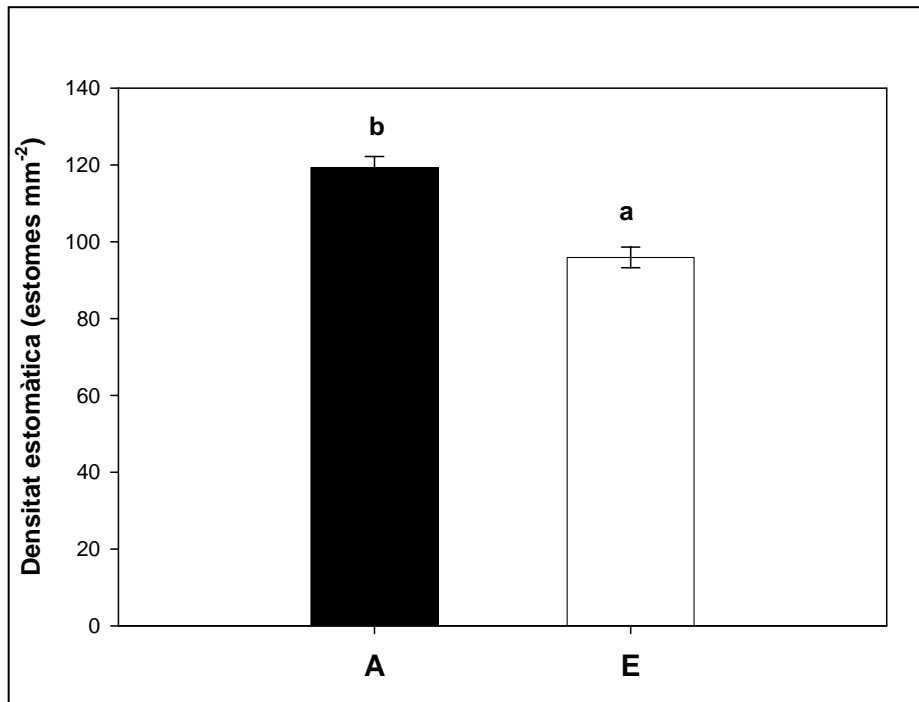
Les fulles de *Chamaerops humilis*, amfiestomàtiques, van presentar una densitat estomàtica superior a la cara abaxial que a l'adaxial (Fig. 4.2.31). El CO<sub>2</sub> elevat va reduir significativament, al voltant d'un 20%, el nombre d'estomes per unitat d'àrea, tant a la cara adaxial com a la cara abaxial.



**Figura 4.2.31.** Densitat estomàtica a la cara adaxial i a l'abaxial de les fulles de *Chamaerops humilis* (n=8).



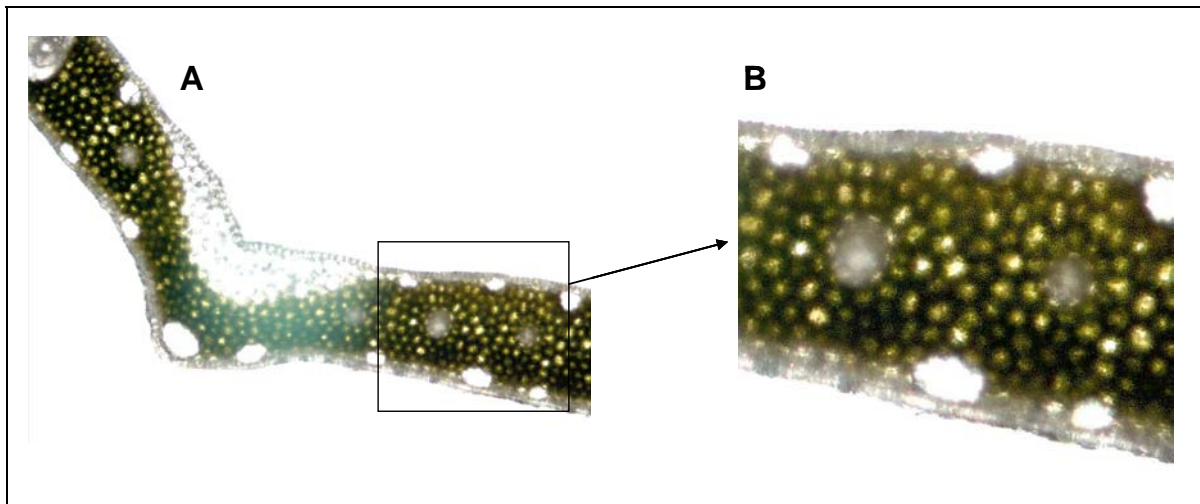
A *Cycas revoluta*, amb estomes únicament a la cara adaxial, es va observar el mateix efecte del CO<sub>2</sub>. És a dir, les plantes aclimatades a CO<sub>2</sub> elevat van presentar una densitat estomàtica un 20% inferior a les plantes A (Fig. 4.2.32).



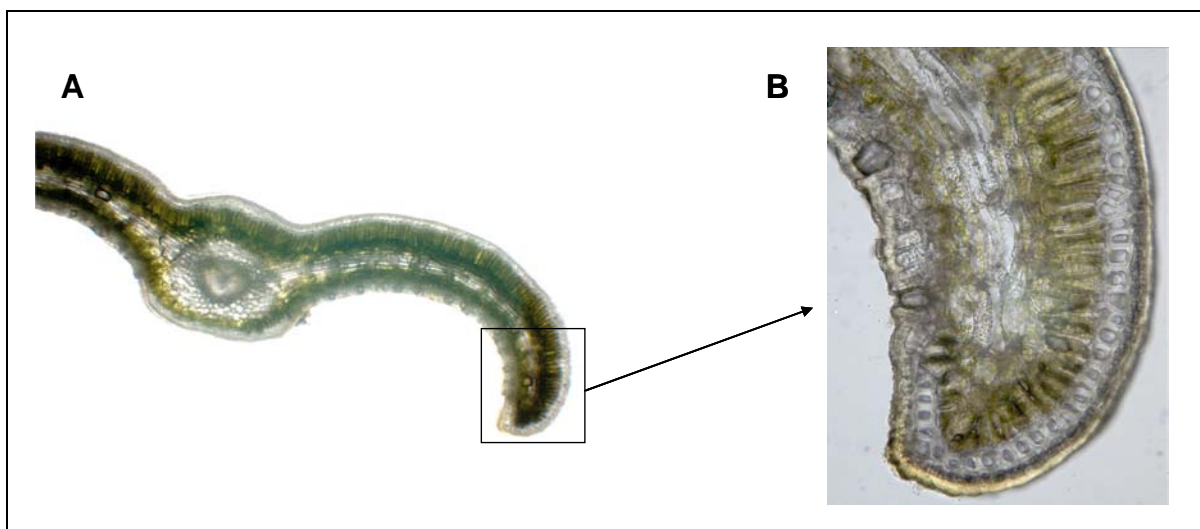
**Figura 4.2.32.** Densitat estomàtica a la cara abaxial de les fulles de *Cycas revoluta* (n=8).

#### 4. 2. 6. TALLS HISTOLÒGICS DE FULLES

Els talls histològics realitzats sobre *Chamaerops humilis* van mostrar l'anatomia foliar característica d'una monocotiledònia, amb els feixos vasculars organitzats longitudinalment al llarg de la fulla i paral·lels entre sí (Fig. 4.2.33A). El mesofil·le va estar format per una elevada densitat de cèl·lules fotosintètiques de morfologia uniforme i disposades al voltant dels vasos (Fig. 4.2.33B).



**Figura 4.2.33.** Secció transversal de fulla de *Chamaerops humilis*. (A) Vista general, 40X. (B) Detall del mesofil·le fotosintètic, conformat per un únic tipus de cèl·lules, 100X.



**Figura 4.2.34.** Secció transversal de fulla de *Cycas revoluta*, (A) Vista general, 25X. (B) Ampliació on s'observa el parènquima en palissada i els estomes enfonsats al revers, 90X.

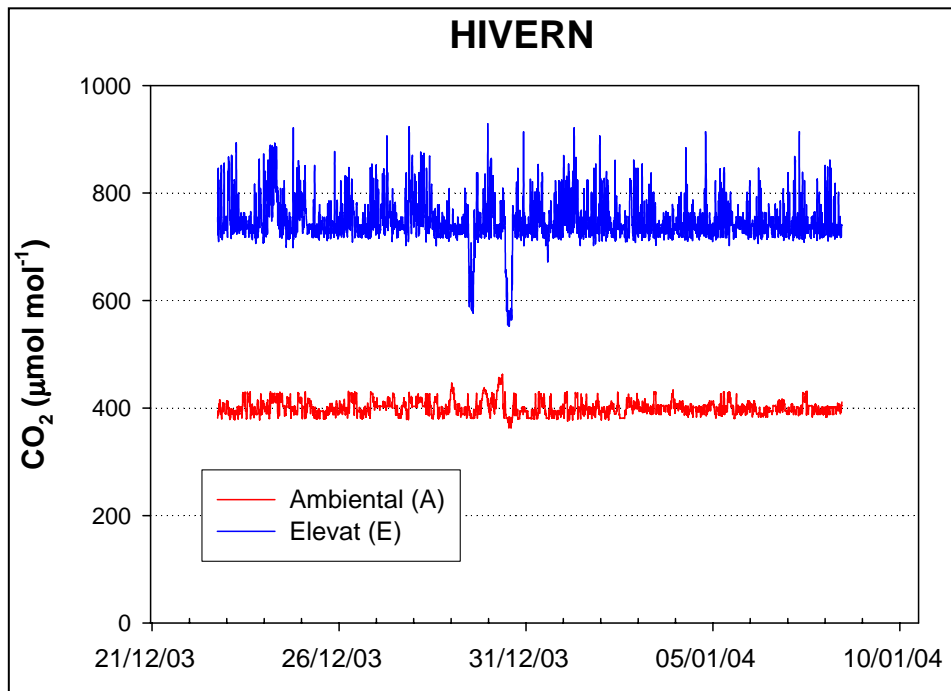
En canvi, a *Cycas revoluta* els feixos vasculars es van trobar agrupats a la regió central de la fulla, que va formar la nervadura principal (Fig. 4.2.34A). Les cèl·lules fotosintètiques es van trobar majoritàriament a la zona més propera a l'anvers, on s'observa un parènquima en palissada ben estructurat. A la zona mitja, l'estructura va ser més laxa, mentre que al revers la densitat i l'estructuració de les cèl·lules fotosintètiques va tornar a augmentar, encara que sense arribar a l'observada a l'anvers.

### 4. 3. GESTIÓ DEL CARBONI ASSIMILAT EN PLANTES DE CREIXEMENT LENT

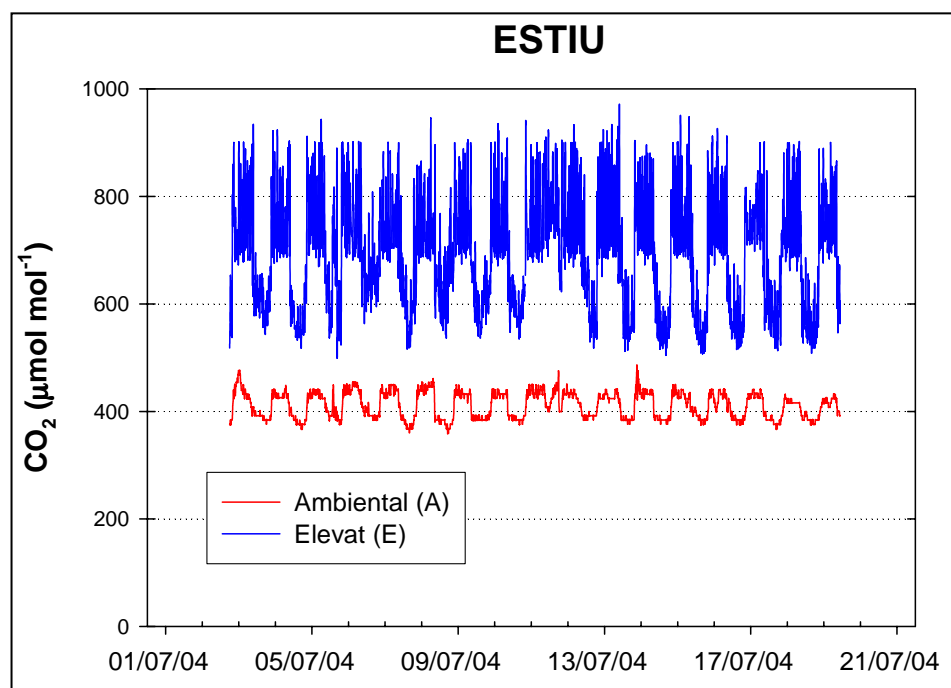
#### 4. 3. 1. DISTRIBUCIÓ DEL CARBONI ASSIMILAT ENTRE ELS DIFERENTS ÒRGANS DE LA PLANTA

Als dos mòduls de l'hivernacle es van mantenir unes concentracions atmosfèriques de CO<sub>2</sub> ben diferents. Es pot observar com la concentració al mòdul elevat (E) va ser molt superior a la del mòdul ambiental (A), tant als períodes hivernals com als estivals. Durant els períodes freds, els nivells de CO<sub>2</sub> van ser bastant estables, sobretot al mòdul ambiental (Fig. 4.3.1). A les èpoques més càlides, va ser necessari obrir les finestres de l'hivernacle per reduir la temperatura interior. Bàsicament, aquesta ventilació va produir disminucions dels nivells de CO<sub>2</sub> del mòdul elevat, que es van compensar augmentant el cabal i la freqüència d'injecció de CO<sub>2</sub> pur. Per això, a l'estiu es poden observar majors fluctuacions al registre de concentració de CO<sub>2</sub>, especialment al mòdul elevat, però també n'hi va haver al mòdul ambiental, lleugerament influït pel CO<sub>2</sub> injectat (Fig.4.3.2).

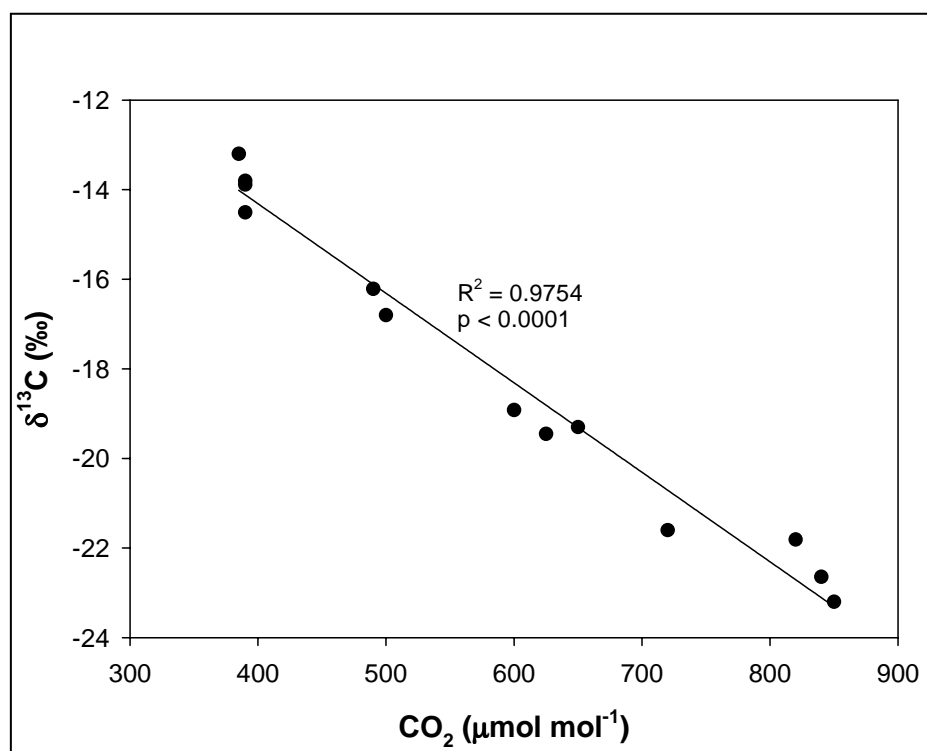
La correlació entre la concentració de CO<sub>2</sub> de l'aire i la seva composició isotòpica del carboni ( $\delta^{13}\text{C}$ ) va ser molt estreta. D'aquesta manera, la injecció de CO<sub>2</sub> a una  $\delta^{13}\text{C} = -32.0\text{‰}$  va alterar de manera simultània la concentració i la  $\delta^{13}\text{C}$  del CO<sub>2</sub> de l'aire de creixement (Fig. 4.3.3). Per obtenir el valor de  $\delta^{13}\text{C}$  del CO<sub>2</sub> de l'aire durant el cultiu, es va calcular la mitjana de la concentració de CO<sub>2</sub> diürna de tot aquest període a partir de les mesures enregistrades de CO<sub>2</sub>. Un cop obtinguda aquesta concentració es va aplicar la relació anterior per estimar la composició isotòpica de l'aire de cada mòdul. Els resultats corroboren que la injecció va incrementar la concentració de CO<sub>2</sub> mentre que va empobrir-ne la composició isotòpica del carboni (Taula 4.3.1).



**Figura 4.3.1.** Exemple del registre de la concentració de CO<sub>2</sub> atmosfèric mesurada en continu a cadascun dels mòduls de l'hivernacle (Ambiental i Elevat), corresponent a un període hivernal.



**Figura 4.3.2.** Exemple del registre de la concentració de CO<sub>2</sub> atmosfèric mesurada en continu a cadascun dels mòduls de l'hivernacle (Ambiental i Elevat), corresponent a un període estival.

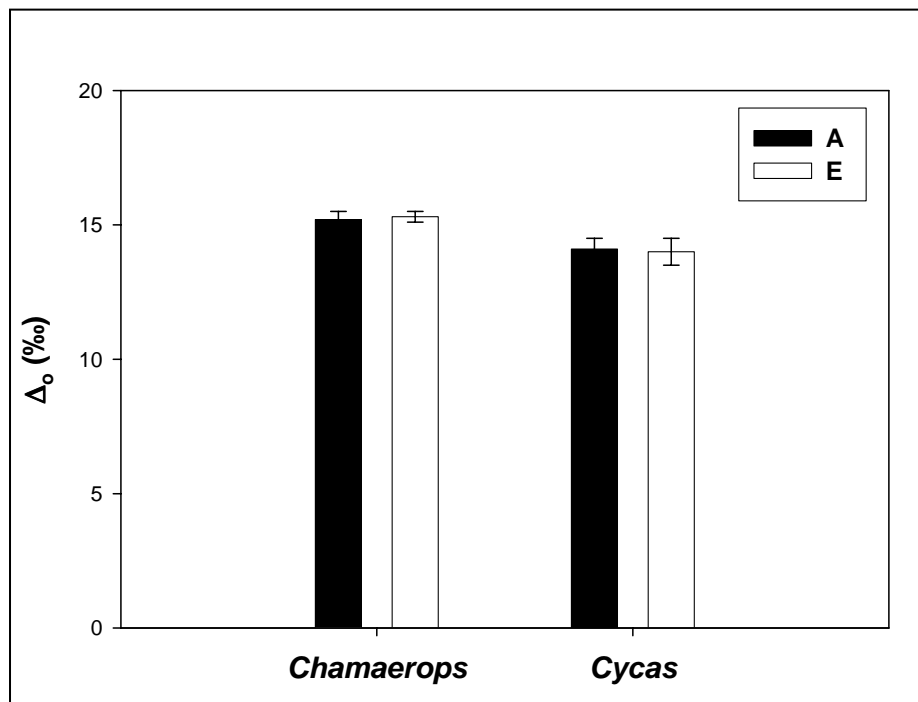


**Figura 4.3.3.** Relació entre la concentració atmosfèrica i la composició isotòpica del carboni ( $\delta^{13}\text{C}$ ) del  $\text{CO}_2$  de l'aire dels hivernacles de l'IRTA a Cabrils (Barcelona).

**Taula 4.3.1.** Estimació de la composició isotòpica del carboni ( $\delta^{13}\text{C}$ ) del  $\text{CO}_2$  de l'aire de creixement a cadascun dels mòduls de l'hivernacle (A i E), realitzada a partir de la mitjana diürna de concentració de  $\text{CO}_2$  per a cada període.

Període de creixement		A		E	
		$\text{CO}_2$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\text{CO}_2$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
<b>Inicial</b>	<b>0 - 5 mesos</b>	426	-14.4	694	-20.2
<b>Final</b>	<b>5 - 20 mesos</b>	402	-13.9	627	-18.9
<b>Total</b>	<b>0 - 20 mesos</b>	407	-14.0	642	-19.2

Mitjançant les cambres de bescanvi de gasos de la capçada es va mesurar la discriminació fotosintètica del carboni ( $\Delta_o$ ) en ambdues espècies i tractaments de  $\text{CO}_2$ . No es va observar efecte a llarg termini del  $\text{CO}_2$  elevat sobre la discriminació (Fig. 4.3.4). Comparant entre espècies, *Chamaerops humilis* va presentar una discriminació lleugerament superior a la mesurada a *Cycas revoluta* (Fig. 4.3.4).



**Figura 4.3.4.** Discriminació isotòpica fotosintètica del carboni a *Chamaerops humilis* i *Cycas revoluta*, mesurada *on line* mitjançant les cambres de bescanvi de gasos de la capçada (n=6).

La composició isotòpica del carboni ( $\delta^{13}\text{C}$ ) de la matèria orgànica a *Chamaerops humilis* va presentar a tots els òrgans analitzats un empobriment en relació a l'aire d'assimilació (Taula 4.3.2). Després de 5 mesos de marcatge, es van donar diferències importants entre tractaments. A les plantes A (no marcades), la  $\delta^{13}\text{C}$  de la matèria orgànica es va reduir entre un 1 i un 2‰ en comparació al punt inicial, mentre que les plantes E van patir un empobriment molt superior, d'aproximadament un 7‰. Al final de l'experiment es van tornar a donar uns resultats semblants als del P<sub>1</sub> (5 mesos), és a dir, es va trobar carboni marcat a tots els òrgans: fulles, tiges i arrels (Taula 4.3.2).

**Taula 4.3.2.**  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) de la matèria orgànica total dels principals òrgans de *Chamaerops humilis* (fulles, tiges i arrels) a diferents moments del marcatge isotòpic de llarga durada (inici, 5 i 20 mesos) (n=6).

Fracció	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>		P <sub>F</sub>	
	punt inicial	5 mesos		20 mesos	
		A	E	A	E
<b>Fulles</b>	-25.3 ± 0.2	-26.9 ± 0.6 b	-31.8 ± 0.3 a	-27.4 ± 0.2 b	-32.6 ± 0.4 a
<b>Tiges</b>	-24.4 ± 0.1	-25.6 ± 0.6 b	-32.0 ± 0.3 a	-26.6 ± 0.3 b	-31.3 ± 0.5 a
<b>Arrels</b>	-24.9 ± 0.1	-26.6 ± 0.6 b	-33.1 ± 0.1 a	-26.9 ± 0.3 b	-32.2 ± 0.6 a

A *Cycas revoluta*, la  $\delta^{13}\text{C}$  inicial de la matèria orgànica va estar empobrida a totes les fraccions estudiades, donant valors entre -24.1 i -25.1‰ (Taula 4.3.3). Els resultats més negatius es van obtenir a les fulles. La  $\delta^{13}\text{C}$  dels diferents òrgans de les plantes A va disminuir molt poc al llarg del temps, menys d'un 0.5‰. Per contra, a les plantes sotmeses a CO<sub>2</sub> elevat es van produir canvis molt importants, donant diferències significatives respecte a la composició isotòpica de les plantes no marcades. Als 5 mesos, el carboni marcat va aparèixer a totes les fraccions analitzades, però en quantitats diferents. Així, cal destacar que la  $\delta^{13}\text{C}$  de les fulles velles pràcticament no es va veure alterada. Les arrels van patir canvis més importants, encara que les fraccions més modificades van ser les fulles de nova formació i els troncs. Després de 20 mesos de marcatge, les plantes E van presentar més quantitat de carboni marcat així com un repartiment més homogeni a totes les fraccions vegetals (Taula 4.3.3).

**Taula 4.3.3.**  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) de la matèria orgànica total dels principals òrgans de *Cycas revoluta* (fulles noves, fulles velles, tronc, arrels gruixudes i arrels fines) a diferents moments del marcatge isotòpic de llarga durada (inici, 5 i 20 mesos) (n=6).

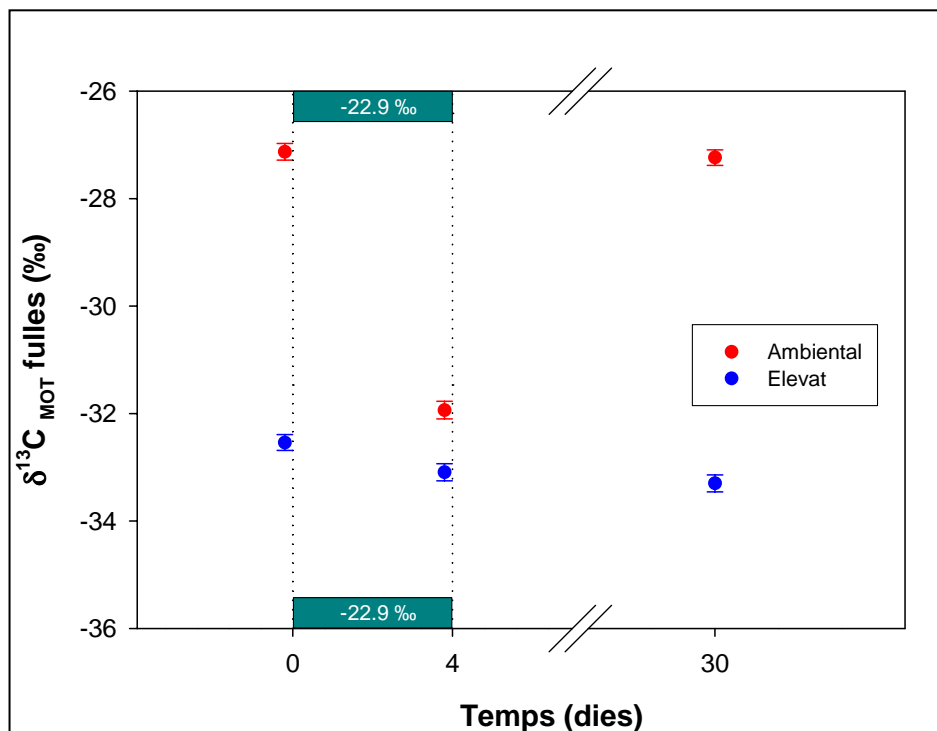
Fracció	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>		P <sub>F</sub>	
	punt inicial	5 mesos		20 mesos	
		A	E	A	E
<b>Fulles N</b>	nd	-24.5 ± 0.4 a	-30.3 ± 0.3 b	nd	nd
<b>Fulles V</b>	-25.1 ± 0.3	-25.4 ± 0.2 a	-26.4 ± 0.2 b	-25.3 ± 0.1 a	-30.5 ± 0.3 b
<b>Tronc</b>	-24.4 ± 0.2	-24.9 ± 0.1 a	-30.0 ± 0.1 b	-25.1 ± 0.2 a	-30.4 ± 0.4 b
<b>Arrels G</b>	-24.3 ± 0.1	-25.0 ± 0.1 a	-28.3 ± 0.2 b	-25.1 ± 0.2 a	-29.8 ± 0.5 b
<b>Arrels F</b>	-24.1 ± 0.2	-24.4 ± 0.3 a	-29.0 ± 0.1 b	-24.5 ± 0.3 a	-30.0 ± 0.2 b



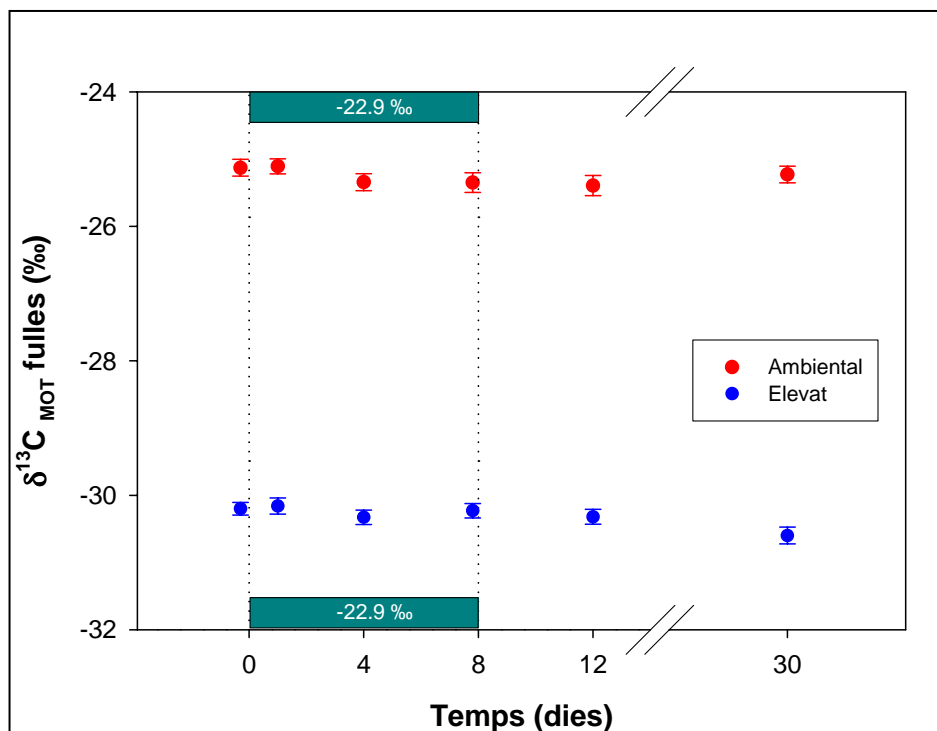
#### 4. 3. 2. ACUMULACIÓ A LES FULLES DEL CARBONI RECENTMENT ASSIMILAT

La figura 4.3.5 mostra l'evolució de la composició isotòpica del carboni de la matèria orgànica ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$ ) de les fulles de *Chamaerops humilis* abans, als 4 dies i 30 dies després d'un marcatge de curta durada (4 dies), realitzat sobre plantes no marcades prèviament (A, Ambiental) i sobre altres que havien estat sotmeses a un marcatge de llarga durada durant 20 mesos (E, Elevat). Abans d'iniciar el marcatge curt, la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  de les fulles de les plantes E (-32.5‰) va ser molt més negatiu que la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  de les fulles de les plantes A (-27.1‰), a conseqüència del marcatge de llarga durada. Després de 4 dies assimilant carboni empobrit en  $^{13}\text{C}$ , la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  de les fulles de les plantes A va disminuir dràsticament (-31.9‰), aproximant-se molt a la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  de les fulles de les plantes E. És a dir, es va detectar una gran quantitat de carboni marcat a les fulles de les plantes A. En aquest punt, la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  de les fulles de les plantes provinents del marcatge llarg pràcticament no va variar, ja que la  $\delta^{13}\text{C}$  de l'aire del marcatge curt va ser molt similar a la del marcatge llarg. Passats els 4 dies de marcatge curt es van retornar les plantes a les seves condicions originals de creixement, i als 30 dies es va mesurar novament la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  de les fulles. Les fulles de les plantes A van recuperar el valor de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  que hi havia abans del marcatge curt (-27.2‰). En el cas de les plantes sotmeses a marcatge llarg, lògicament, la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  de les fulles es va mantenir estable, molt similar als dos punts anteriors.

De la mateixa manera que *Chamaerops humilis*, *Cycas revoluta* mostra importants diferències a la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  de les fulles entre les plantes marcades (-30.2‰) i no marcades isotòpicament a l'hivernacle (-25.1‰, Fig. 4.3.6). Sorprenentment, l'anàlisi de la matèria orgànica de les fulles després del marcatge de curta durada va mostrar una absència de carboni marcat a les fulles de les plantes A, fins i tot després de duplicar el temps de marcatge. Així, la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  de les fulles va romandre estable en els temps al llarg de tot el seguiment, mantenint-se les diferències inicials entre tractaments.



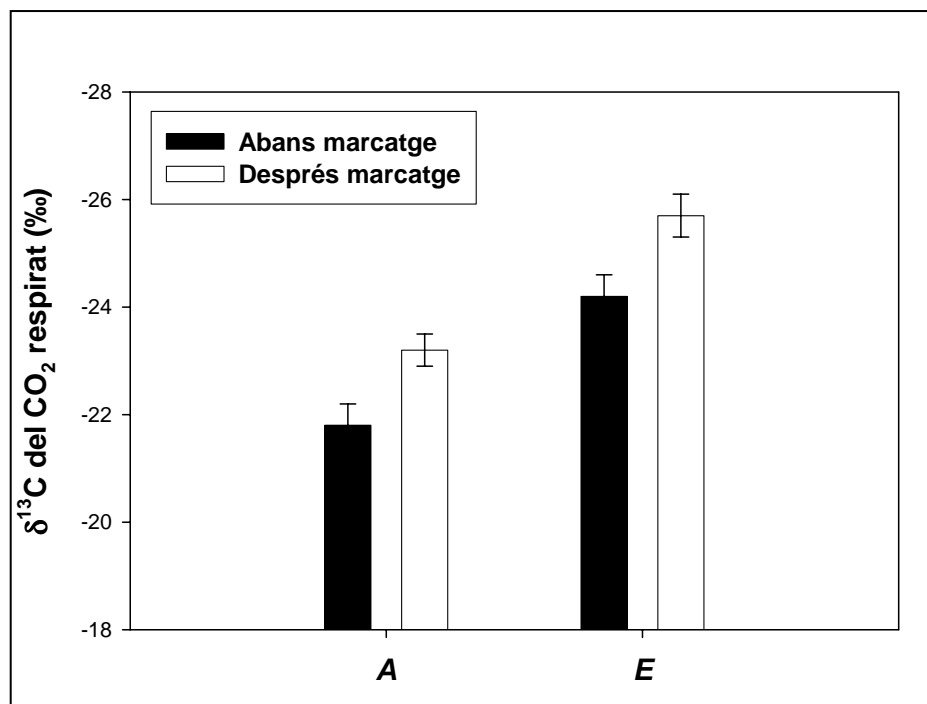
**Figura 4.3.5.** Seguiment de la  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) de la matèria orgànica total de les fulles de *Chamaerops humilis* al llarg del marcatge isotòpic de curta durada (n=4).



**Figura 4.3.6.** Seguiment de la  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) de la matèria orgànica total de les fulles de *Cycas revoluta* al llarg del marcatge isotòpic de curta durada (n=4).

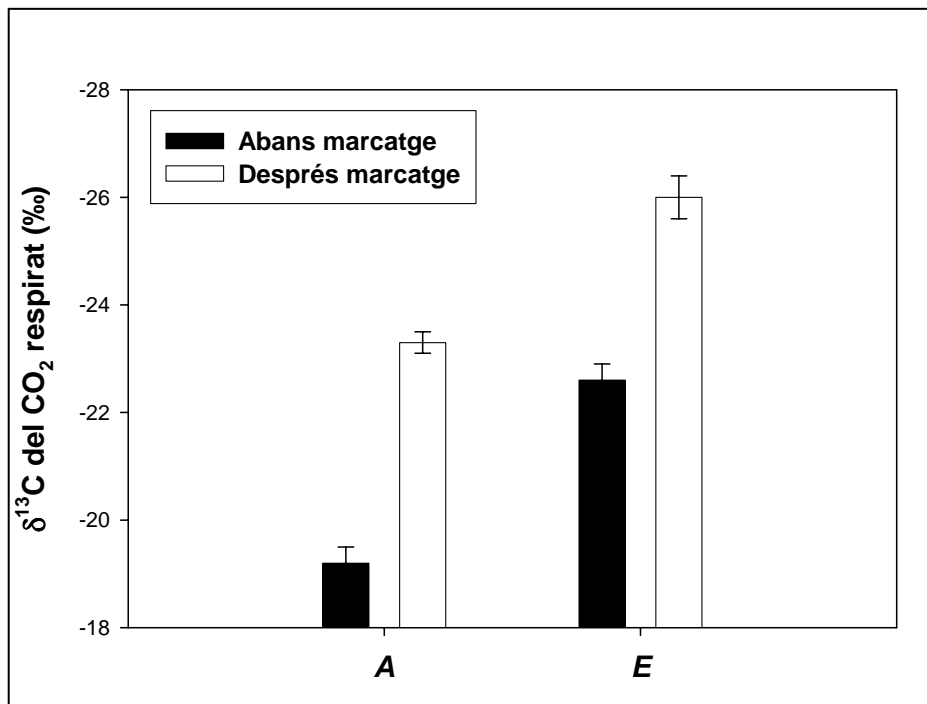
#### 4. 3. 3. PARTICIPACIÓ DEL CARBONI RECENTMENT ASSIMILAT EN LA RESPIRACIÓ

La  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  respirat a *Chamaerops humilis* abans del marcatge curt va ser de -21.8 i -24.2‰ a les plantes A i E, respectivament (Fig. 4.3.7). Per tant, el marcatge de llarga durada va provocar una empobriments en la  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  respirat. Després de marcar les plantes amb un aire de  $\delta^{13}\text{C} = -22.9\text{‰}$  durant 4 dies, la  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  respirat va disminuir fins -23.2 i -25.7‰ a les plantes A i E, respectivament, indicant que el carboni assimilat durant el marcatge va participar en la respiració.



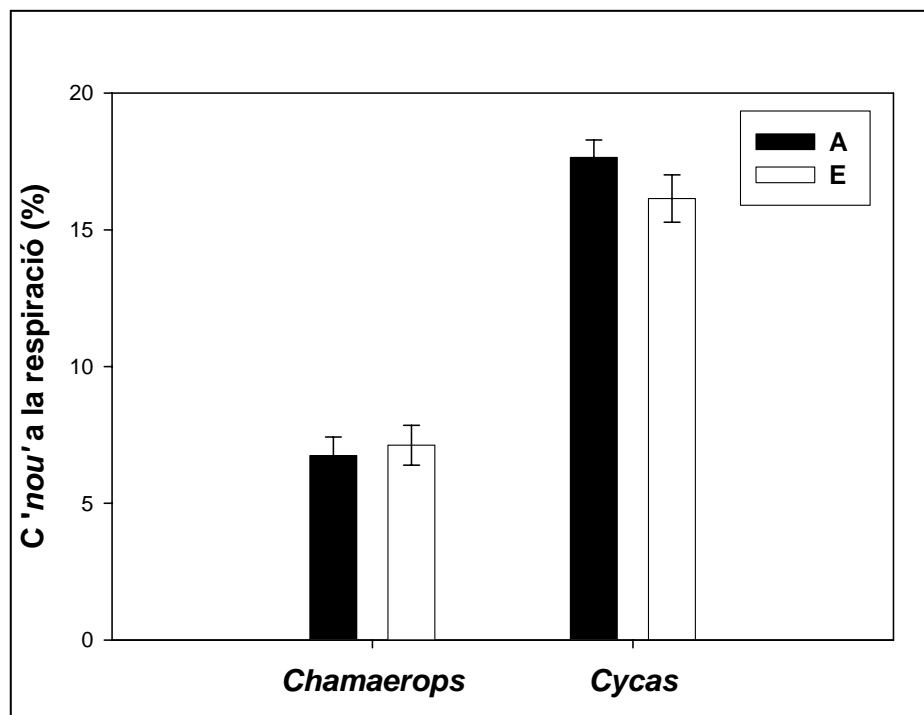
**Figura 4.3.7.**  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  respirat (‰) a *Chamaerops humilis* abans i després del marcatge isotòpic de curta durada, realitzat sobre plantes prèviament marcades (E) i no marcades (A) durant 20 mesos (n=4).

De manera anàloga, a *Cycas revoluta* la  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  respirat abans del marcatge de curta durada va mostrar diferències entre tractaments (A i E). Així, les plantes A van presentar un valor de  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  respirat va ser de  $-19.2\text{‰}$ , mentre que a les plantes E va ser més empobrit ( $-22.6\text{‰}$ , Fig. 4.3.8). El marcatge de curta durada també va fer disminuir la  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  respirat. Aquest valor va arribar a  $-23.3\text{‰}$  a les plantes A i a  $-26.0\text{‰}$  a les plantes E. De nou, el carboni assimilats recentment va estar implicat en la respiració.



**Figura 4.3.8.**  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  respirat (‰) a *Cycas revoluta* abans i després del marcatge isotòpic de curta durada, realitzat sobre plantes prèviament marcades (E) i no marcades (A) durant 20 mesos (n=4).

Per tant, a *Chamaerops humilis* el percentatge de carboni nou present a la respiració va ser molt baix i similars entre tractaments (6.7 i 7.1% a les plantes A i E, respectivament, Fig. 4.3.9). Resulta interessant esmentar que el percentatge de carboni nou implicat en la respiració de *Cycas revoluta* va ser força diferent al de *Chamaerops humilis*. No obstant, tampoc es van observar diferències entre tractaments de CO<sub>2</sub>, 17.6% a les plantes A i 16.1% a les plantes E (Fig. 4.3.9.).



**Figura 4.3.9.** Efecte del CO<sub>2</sub> elevat sobre el % de carboni recentment assimilat present a la respiració mitocondrial a *Chamaerops humilis* i *Cycas revoluta* (n=4). La quantitat de carboni assimilat durant el marcatge va ser en ambdues espècies d'aproximadament 350 mmol C m<sup>-2</sup>.



## **5. DISCUSSIÓ**

---





## 5. DISCUSSIÓ

### 5. 1. DETERMINACIÓ DEL METABOLISME FOTOSINTÈTIC DE *Cycas revoluta* Thunb. i *Chamaerops humilis* L.

El metabolisme fotosintètic d'aquestes espècies és desconegut. Per això, la via d'assimilació fotosintètica del CO<sub>2</sub> (C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> o CAM) es va determinar mitjançant la combinació dels resultats obtinguts a partir de diferents tècniques. Així, es van integrar mesures de bescanvi de gasos, fluorescència de les clorofil·les, estudis amb isòtops estables de carboni i microscòpia òptica.

Els cicles diaris obtinguts amb les cambres de bescanvi de gasos de la capçada van mostrar en ambdues espècies una assimilació de CO<sub>2</sub> positiva durant el dia i negativa durant els períodes de foscor (Figs. 4.2.1 i 4.2.4). Les dades de conductància estomàtica indiquen que els estomes van estar oberts durant els períodes d'il·luminació, mentre que a la nit van romandre tancats (Figs. 4.2.3 i 4.2.6). Per tant, la cinètica dels cicles diaris va descartar el metabolisme CAM tant a *Chamaerops humilis* com a *Cycas revoluta*. Aquest metabolisme es caracteritza per una obertura estomàtica nocturna que permet l'entrada de CO<sub>2</sub> als teixits de la planta, el qual és assimilat per acció de la PEP carboxilasa (Acevedo *et al.* 1983, Gibson i Nobel 1986, Larcher 2003).

Les corbes A/c<sub>i</sub> mostren una resposta positiva de l'assimilació neta de CO<sub>2</sub> de *Chamaerops humilis* i *Cycas revoluta* a l'increment de la concentració de CO<sub>2</sub> intercel·lular (c<sub>i</sub>). En ambdues espècies, el pendent inicial de la corba va ser relativament suau, donant-se una saturació de la taxa de fotosíntesi al voltant de 600 ppm de c<sub>i</sub> (Figs. 4.2.25 i 4.2.27). Habitualment, les plantes C<sub>4</sub> presenten un fort increment inicial de la fotosíntesi en resposta al CO<sub>2</sub> i arriben a saturar l'assimilació de CO<sub>2</sub> a un c<sub>i</sub> al voltant de 150 ppm (Dai *et al.* 1993, Ehleringer *et al.* 1997). D'altra banda, la taxa màxima de fotosíntesi obtinguda en ambdues espècies va ser tan baixa que tampoc sembla compatible amb un metabolisme C<sub>4</sub>. Un altre paràmetre en què difereixen les plantes C<sub>3</sub> i les C<sub>4</sub> és el punt de compensació de CO<sub>2</sub> (Γ). Habitualment, a les plantes C<sub>4</sub> se situa entre 2 i 10 ppm, mentre que a les plantes C<sub>3</sub> entre 50 i 100 ppm (Berry i Downton 1982, Tolbert 1997, Larcher 2003). Per tant, els valors de Γ obtinguts tant a escala de fulla (Taules 4.2.5 i 4.2.6) com de capçada (Figs. 4.2.18 i 4.2.20) suggereixen que no es tracta de plantes C<sub>4</sub>. Les corbes de resposta al CO<sub>2</sub> del rendiment quàntic relatiu del fotosistema II (Φ<sub>PSII</sub>, Figs. 4.2.26 i 4.2.28) van reforçar les dades de les

corbes  $A/c_i$ , ja que en plantes  $C_4$  s'esperaria una saturació a del  $\Phi_{PSII}$  a concentracions més baixes de  $c_i$  que a les observades (Dai *et al.* 1993, Lawson *et al.* 2002, Tambussi *et al.* 2005).

Entre totes les tècniques utilitzades per tal de definir el metabolime fotosintètic d'aquestes espècies, l'ús d'isòtops estables de carboni tradicionalment ha estat la metodologia més definitiva i fiable (Lloyd i Farquhar 1994). Així, la discriminació isotòpica del carboni mesurada *on line* durant la fotosíntesi ( $\Delta_o$ , Fig. 4.3.4) a *Chamaerops humilis* (15‰) i a *Cycas revoluta* (14‰) indica que l'enzim responsable de l'assimilació inicial del  $CO_2$  en aquestes espècies és la Rubisco, ja que la discriminació associada a la PEPc és molt inferior (Evans *et al.* 1986, Farquhar *et al.* 1989, Henderson *et al.* 1992, Nogués *et al.* 2006b). Aquesta discriminació fotosintètica és relativament petita per una planta  $C_3$ , però està justificada per una baixa conductància estomàtica, que va fer disminuir el  $c_i/c_a$  a valors propers a 0.5. La composició isotòpica del carboni de la matèria orgànica ( $\delta^{13}C_{MOT}$ ) integra els processos esdevinguts al llarg de la vida del teixit. La matèria orgànica de tots els òrgans va estar molt empobrida en  $^{13}C$  respecte a l'aire de creixement (Taules 4.3.2 i 4.3.3), la qual cosa demostra que el carboni assimilat ha patit importants processos de discriminació. Les plantes  $C_3$  i  $C_4$  presenten fortes diferències degudes a l'activitat dels enzims de carboxilació, principal procés on té lloc la discriminació. D'aquesta manera, la discriminació *in vitro* de la Rubisco és 28.2‰, mentre que a la PEPc és inferior al 5‰ (Brugnoli i Farquhar 2000). Per això, la composició isotòpica habitual a la matèria orgànica de les plantes  $C_4$  no és tan negativa com la de les plantes  $C_3$  (Farquhar *et al.* 1989, Lloyd i Farquhar 1994, Edwards *et al.* 2004). Per tant, l'empobriment en  $^{13}C$  de la matèria orgànica en ambdues espècies és atribuïble en gran mesura a l'activitat de la Rubisco (Farquhar *et al.* 1989).

Els talls histològics observats per mitjà del microscopi òptic a *Chamaerops humilis* i *Cycas revoluta* (Figs. 4.2.33 i 4.2.34) mostren una absència d'anatomia Kranz, típica de les  $C_4$  (Laetsch 1974, Dengler i Nelson 1999). No obstant, no es tracta d'una dada conclouent, ja que s'ha descrit l'existència de dues espècies de plantes terrestres, *Bienertia cycloptera* i *Borszczowia aralocaspica* (Chenopodiaceae), amb metabolisme  $C_4$  complet a l'interior d'una mateixa cèl·lula del clorènquima i, per tant, sense necessitat d'anatomia Kranz (Voznezenskaya *et al.* 2001, Sage 2002, Edwards *et al.* 2004).

La producció de biomassa també va ser indicadora que no es tractava de plantes  $C_4$ . En primer lloc a causa de l'elevada productivitat característica de les plantes  $C_4$  (Ehleringer *et al.* 1997)

en contraposició a la baixíssima taxa de creixement de *Chamaerops humilis* i *Cycas revoluta*. En segon lloc per l'estimulació de la producció de biomassa en resposta al CO<sub>2</sub>. Poorter i Navas (2003) van descriure que l'increment mitjà de biomassa en resposta al CO<sub>2</sub> elevat observat a 41 espècies de plantes C<sub>4</sub> va ser del 12%, valor que queda molt per sota del 80% de *Chamaerops humilis* o del 152% de *Cycas revoluta*.

En resum, l'anàlisi integrat de les dades de bescanvi de gasos, fluorescència de les clorofil·les, isòtops estables, microscòpia i, fins i tot de biomassa, mostra que el metabolisme fotosintètic d'ambdues espècies és del tipus C<sub>3</sub>.

## 5. 2. FISIOLOGIA DE LA RESPOSTA AL CO<sub>2</sub> ELEVAT

El CO<sub>2</sub> és un factor ambiental de vital importància pels vegetals, per això les seves variacions tenen un impacte molt important i simultani sobre múltiples processos. Els efectes que produeix el CO<sub>2</sub> sobre les plantes es classifiquen, clàssicament, en directes o indirectes. Els directes o immediats són aquells que es manifesten en un curt termini de temps, de manera pràcticament instantània. D'altra banda, els efectes indirectes, aclimatatius o a llarg termini es produeixen a conseqüència d'una resposta més lenta, després d'una exposició més llarga. En aquesta tesi s'avaluen tant els efectes directes com els indirectes del CO<sub>2</sub> sobre la resposta estomàtica, fotosintètica i respiratòria d'aquestes dues espècies de creixement lent, sotmeses a una exposició de 20 mesos a CO<sub>2</sub> elevat.

### 5. 2. 1. RESPOSTA ESTOMÀTICA

El creixement durant 20 mesos a una concentració de CO<sub>2</sub> elevada ha tingut un impacte important sobre la densitat estomàtica de *Chamaerops humilis* i *Cycas revoluta*. En ambdues espècies es va produir una reducció del nombre d'estomes al voltant del 20% (Figs. 4.2.31 i 4.2.32). La literatura recull increments i disminucions a la densitat estomàtica de plantes sotmeses a CO<sub>2</sub> elevat, encara que la resposta més habitual és una reducció en el nombre d'estomes (Gunderson i Wullschleger 1994, Drake *et al.* 1997). Aquesta disminució està reforçada per estudis realitzats amb material d'herbari, on s'observa una correlació entre l'increment de CO<sub>2</sub> associat a la revolució industrial i els descens del nombre d'estomes

(Woodward 1987, Peñuelas i Matamala 1990, Serna i Fenoll 2000). El mecanisme d'acció és desconegut, encara que l'any 2000 es va caracteritzar a *Arabidopsis* un gen que hi podria estar implicat. Es tracta del gen *HIC* (*High Carbon Dioxide*), que codifica per un enzim implicat a la biosíntesi d'àcids grassos de cadena llarga, el qual actuaria com un regulador negatiu del desenvolupament estomàtic en condicions de CO<sub>2</sub> elevat. Per això, plantes mutants en el gen *HIC* exposades a CO<sub>2</sub> elevat no mostren un descens en el nombre d'estomes (Gray *et al* 2000, Beerling 2005).

La disminució al nombre d'estomes a les plantes aclimatades a elevat CO<sub>2</sub> (E) d'ambdues espècies sembla clarament relacionada amb el descens de conductància estomàtica observat a les mesures de bescanvi de gasos de la capçada (Figs. 4.2.3 i 4.2.6). A *Cycas revoluta* la reducció de conductància estomàtica va ser proporcional a la disminució del nombre d'estomes (Taules 4.2.3 i 4.2.4). En canvi, a *Chamaerops humilis* la davallada de conductància en resposta al CO<sub>2</sub> elevat va ser molt superior a la reducció de densitat estomàtica (Taules 4.2.1 i 4.2.2), posant de manifest un important tancament estomàtic addicional (Buckley *et al.* 2003). D'altra banda, els cicles diaris de conductància estomàtica també van mostrar un efecte directe del CO<sub>2</sub> elevat sobre l'obertura estomàtica (Figs. 4.2.3 i 4.2.6). És a dir, en les dues espècies la conductància estomàtica va ser menor a 800 ppm de CO<sub>2</sub> que a 400. El mecanisme responsable d'aquest fenomen encara està per aclarir. No obstant, podria ser explicat a causa de l'existència d'una regulació estomàtica a través del  $c_i$  (Mott 1988). Més recentment, s'ha observat que la resposta estomàtica al CO<sub>2</sub> pot modelar-se amb precisió assumint que la disponibilitat d'ATP regula la turgència de les cèl·lules de guarda, i que els nivells d'ATP en aquestes cèl·lules segueixen estant controlats pels mateixos factors que els nivells del mesofil·le (Buckley *et al.* 2003). Això és consistent amb l'observació que el transport electrònic fotosintètic a les cèl·lules de guarda segueix les respostes del transport electrònic fotosintètic al mesofil·le (Lawson *et al.* 2002). De totes maneres, aquest mecanisme hauria d'operar en combinació amb algun altre, ja que en condicions de foscor, els estomes s'obren en resposta a una disminució dels nivells de CO<sub>2</sub>.

### 5. 2. 2. RESPOSTA DE LA FOTOSÍNTESI

A les corbes  $A/c_i$  d'ambdues espècies, es pot observar com l'assimilació de CO<sub>2</sub> va respondre molt positivament a un increment instantani de la concentració de CO<sub>2</sub> (Figs. 4.2.25 i 4.2.27).

Aquest efecte directe del CO<sub>2</sub> elevat sobre la fotosíntesi és resultat de dues propietats de la Rubisco de les plantes C<sub>3</sub> terrestres. En primer lloc, la K<sub>m</sub> de l'enzim pel CO<sub>2</sub> és propera a la concentració atmosfèrica actual, i per tant, un increment en la concentració de CO<sub>2</sub> augmenta la velocitat de carboxilació. En segon lloc, el CO<sub>2</sub> inhibeix competitivament l'activitat oxigenasa de la Rubisco, que dona lloc a la fotorespiració. D'aquesta manera, l'elevat CO<sub>2</sub> incrementa la taxa de fotosíntesi millorant la carboxilació, així com disminuint els efectes negatius associats a la fotorespiració, com són una pèrdua de CO<sub>2</sub> i el desviament d'ATP i NADPH generats a les reaccions lluminoses (Long *et al.* 2004).

L'efecte a llarg termini del CO<sub>2</sub> elevat sobre la fotosíntesi es pot estudiar comparant les corbes A/c<sub>i</sub> de plantes crescudes a CO<sub>2</sub> ambiental (A) i elevat (E, Figs. 4.2.25 i 4.2.27). En aquest punt sí que es pot observar una resposta al CO<sub>2</sub> diferent entre espècies. Així, a *Chamaerops humilis* les plantes E van presentar una clara regulació a la baixa o *down-regulation* de la fotosíntesi, caracteritzada per una disminució tant al pendent inicial de la corba com a la fase de saturació. És a dir, es va donar una reducció de la velocitat màxima de carboxilació de la Rubisco (V<sub>c,max</sub>), la taxa de transport electrònic màxim potencial que contribueix a la regeneració de la RuBP (J<sub>max</sub>), la capacitat fotosintètica (A<sub>sat</sub>) i la taxa màxima d'assimilació neta de CO<sub>2</sub> en condicions de llum i CO<sub>2</sub> saturants (A<sub>max</sub>, Taula 4.2.5). Els valors obtinguts de rendiment quàntic màxim (F<sub>v</sub> / F<sub>m</sub>), al voltant de 0.8 en ambdós tractaments, descartarien la disminució de la fotosíntesi observada a les plantes E sigui deguda a danys al PSII (Taula 4.2.5, Nogués i Baker 2000).

Per tant, el CO<sub>2</sub> elevat estimula la fotosíntesi de *Chamaerops humilis* a curt termini, a través d'un efecte directe, que es perd amb el temps ja que es produeix una aclimatació fotosintètica al CO<sub>2</sub> elevat. Aquesta resposta ha estat descrita prèviament a moltes espècies. Està bastant acceptat que existeixen dues raons principals que expliquen aquest fenomen. La primera és una incapacitat per processar els sucres addicionals que proporciona l'efecte directe del CO<sub>2</sub> sobre la fotosíntesi. Així, es dona una disminució de l'activitat de la font a conseqüència d'un fenomen de retroalimentació negativa. En segon lloc, es produeix una reducció en la quantitat i en l'activitat de la Rubisco (Bowes 1993, Drake *et al.* 1997, Long *et al.* 2004). L'increment en el contingut de carboni i la reducció de nitrogen als teixits de *Chamaerops humilis* (Taula 4.2.7 i 4.2.8), així com un augment del pes específic foliar (Taula 4.1.1), apunten en aquesta direcció. Així, malgrat les baixes taxes observades, l'increment de fotosíntesi a CO<sub>2</sub> elevat s'hauria traduït en un augment de carbohidrats a les fulles, un esdeveniment quasi universal a

les plantes  $C_3$  (Azcón-Bieto 1983, Nie *et al.* 1995, Drake *et al.* 1997, Moore *et al.* 1999, Long *et al.* 2004). A les cèl·lules fotosintètiques de moltes plantes, la sacarosa és el principal fotoassimilat i la forma majoritària de translocació del carboni assimilat. Per això, els nivells de sacarosa a les fulles reflecteixen l'equilibri entre la font (*source*) i els embornals de carboni (*sink*), però també poden modular el transport de carboni a nivell de la planta sencera (Farrar *et al.* 2000). Un model proposat per Moore *et al.* (1999) indica que el desencadenant de l'aclimatació fotosintètica no es basa en una acumulació general de carbohidrats a la fulla, si no que es donaria a través del *pool* de sacarosa a la cèl·lula. Així, un excés no exportat de sacarosa s'acumularia al vacúol, el processament de la qual comportaria un increment de l'activitat de l'hexoquinasa al citoplasma que donaria lloc a una disminució en l'expressió gènica de la Rubisco. Revisions posteriors no descarten aquest model, però indiquen que diversos punts de la via de la transducció del senyal entre l'hexoquinasa i la reducció de l'expressió gènica estan per aclarir. No obstant, coincideixen que la diana del control via sucres és la subunitat petita de la Rubisco (Smeekens 2000, Rolland *et al.* 2002).

La disminució de N observada a les fulles de les plantes E (Taula 4.2.9) podria explicar l'aclimatació fotosintètica al  $CO_2$  elevat de *Chamaerops humilis*. La síntesi de Rubisco suposa la major inversió en nitrogen, ja que constitueix al voltant d'un 50% del total de proteïna soluble i el 25% del nitrogen foliar en una planta  $C_3$  (Drake *et al.* 1997, Eichelmann i Laisk 1999). Per això, sembla clar que una reducció al nitrogen foliar faria disminuir els nivells de Rubisco i, per tant, justificaria el descens observats en la  $V_{c,max}$ ,  $J_{max}$ ,  $A_{sat}$  i  $A_{max}$ , així com l'augment del punt de compensació de  $CO_2$  (Nakano *et al.* 1997, Stitt i Krapp 1999). La davallada de N a les fulles de les plantes aclimatades a  $CO_2$  elevat pot ser deguda a dos factors simultanis. En primer lloc, a causa d'una reducció en l'expressió de Rubisco. En segon lloc, per un fenomen de dilució del nitrogen a conseqüència de l'increment de biomassa a les plantes E. Així, el  $CO_2$  elevat pot provocar limitacions de nitrogen o empitjorar les ja existents (Makino *et al.* 1997, Stitt i Krapp 1999). Farage *et al.* (1998) van demostrar que la reducció de l'aclimatació també es pot aconseguir incrementant la dosi de nitrogen aportada.

A *Chamaerops humilis*, la resposta del transport electrònic al  $c_i$  va ser molt similar a la descrita per l'assimilació de  $CO_2$  (Fig. 4.2.26). Així, el  $\Phi_{PSII}$  va incrementar per efecte directe del  $CO_2$ , mentre que a conseqüència d'una exposició a llarg termini a  $CO_2$  elevat, les plantes E van mostrar una disminució del transport electrònic. L'elevat  $CO_2$  provoca un increment en la velocitat de carboxilació, produint-se més consum d'ATP i NADPH al cicle de Calvin. En

aquestes condicions, s'evita una acumulació de poder reductor al final de la cadena de transport electrònic i permet que una fracció més important de fotons absorbits siguin canalitzats a través dels fotosistemes i generin transport electrònic (Allen *et al.* 1998, Lawson *et al.* 2002). D'altra banda, sembla que la resposta a llarg termini del transport electrònic al CO<sub>2</sub> elevat pot estar condicionada per una menor activitat de la fase reductora de la fotosíntesi o bé per una reducció de maquinària associada a la disminució del nitrogen foliar (Nogués *et al.* 2000, Zerihun *et al.* 2000, Tambussi *et al.* 2005, Walters 2005).

La reducció de la conductància estomàtica en plantes aclimatades a CO<sub>2</sub> elevat discutida anteriorment sembla jugar un paper important en la disminució de la capacitat fotosintètica de *Chamaerops humilis*. Així, a les plantes E es va observar una limitació estomàtica ( $l$ ) de la fotosíntesi molt superior a la de les plantes crescudes a CO<sub>2</sub> ambiental (Taula 4.2.5). És a dir, per una mateixa concentració de CO<sub>2</sub> a l'aire, les plantes E van tenir un  $c_i/c_a$  inferior a les plantes A. Per tant, el tancament estomàtic els va dificultar l'entrada del CO<sub>2</sub> als espais aeris intercel·lulars, de manera que la Rubisco va treballar en condicions subòptimes (Farquhar i Sharkey 1982, Drake *et al.* 1997, Nogués i Baker 2000).

Les corbes  $A/c_i$  obtingudes a *Cycas revoluta*, a diferència de *Chamaerops humilis*, no van mostrar diferències entre tractaments. És a dir, no s'observa un efecte indirecte o a llarg termini del CO<sub>2</sub> elevat sobre la fotosíntesi (Fig. 4.2.27). La resposta al CO<sub>2</sub> del  $\Phi_{PSII}$  tampoc va resultar diferent entre tractaments (Fig. 4.2.28). Per tant, l'anàlisi de les corbes indica una absència d'aclimatació fotosintètica al CO<sub>2</sub> elevat a *Cycas revoluta*, ja que la  $V_{c,max}$ ,  $J_{max}$ ,  $A_{sat}$ ,  $A_{max}$ ,  $\Gamma$ ,  $l$ , així com el transport electrònic van ser iguals en plantes A i plantes E. Resulta molt interessant que aquesta espècie no mostri aclimatació, especialment tenint en compte que també es va produir un descens en el contingut de nitrogen a tots els òrgans (Fig. 4.2.11). El nitrogen va disminuir menys a les fulles que a altres òrgans (tronc o arrels fines), i sembla ser que es va mantenir per sobre de nivells problemàtics, sense arribar a ser limitant. Així, està descrit que algunes espècies són capaces de mitigar o evitar l'aclimatació fotosintètica mantenint els nivells de nitrogen foliar gràcies a una redistribució del N entre els diferents òrgans de la planta (Zerihun *et al.* 2000). D'altra banda, a diversos estudis també s'han observat disminucions en la quantitat de Rubisco que no han provocat una aclimatació fotosintètica al CO<sub>2</sub> (Ainsworth *et al.* 2003, Long *et al.* 2004).

Els resultats obtinguts amb les cambres de bescanvi de gasos de la capçada van permetre estudiar els efectes del CO<sub>2</sub> elevat sobre la fotosíntesi a escala d'individu en interacció amb la temperatura. A *Chamaerops humilis* els cicles diaris de fotosíntesi, expressada per unitat d'àrea, mostren una resposta general al CO<sub>2</sub> similar a l'observada amb les mesures a escala de fulla comentades anteriorment. És a dir, la taxa d'assimilació neta de CO<sub>2</sub> es va incrementar a conseqüència d'un augment instantani de la concentració de CO<sub>2</sub>, mentre que l'efecte del CO<sub>2</sub> a llarg termini va ser negatiu (Fig. 4.2.1). Per tant, a escala de capçada també es va manifestar una *down-regulation* de la fotosíntesi, justificable per la disminució de conductància estomàtica i del contingut en nitrogen. Aquesta aclimatació fotosintètica a la baixa va ser molt important, ja que la taxa de les plantes E a 800 ppm (1.49 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) va ser inferior a la de les plantes A a 400 ppm (1.86 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Com era d'esperar, l'increment de temperatura va afectar negativament la fotosíntesi, ja que l'òptim fotosintètic de la majoria de plantes C<sub>3</sub> és més proper a 25 que a 35°C (Fig. 4.2.21, Larcher 2003). L'efecte directe del CO<sub>2</sub> elevat va ser més beneficiós sobre la fotosíntesi neta a 35°C que a 25°C (Taules 4.2.1 i 4.2.2), a causa d'una millora en l'activitat de la Rubisco. Així, un elevat c<sub>i</sub> produeix un increment de l'òptim tèrmic i afavoreix la carboxilació enfront de l'oxigenació, ja que la fotorespiració es veu molt estimulada per un augment de la temperatura (Farquhar *et al.* 1980, Long *et al.* 2004). Les corbes A/PPFD de la capçada també indiquen una disminució de la fotosíntesi per efecte del CO<sub>2</sub> elevat, ja que sota totes condicions es va produir un descens del pendent de la corba a les plantes E (Fig. 4.2.7).

Tot i la disminució fotosintètica per unitat d'àrea observada al tractament E, en general la integral diària d'assimilació de la capçada va ser superior a les plantes crescudes a CO<sub>2</sub> elevat, a conseqüència d'una àrea foliar molt superior respecte a les plantes A (Fig. 4.2.2 i Taula 4.1.1). Només sota unes condicions bastant desfavorables, 35°C i 400 ppm de CO<sub>2</sub>, la integral de fotosíntesi va ser igual entre plantes A i E (Taula 4.2.2). Així, malgrat l'aclimatació fotosintètica, les plantes E van presentar un guany net de carboni per planta més gran a la seva concentració de CO<sub>2</sub> de creixement que les plantes A, tant a 25 com a 35°C (Taules 4.2.1 i 4.2.2). Per tant, a escala de capçada o de cultiu el CO<sub>2</sub> elevat va continuar essent beneficiós per *Chamaerops humilis* fins i tot després de 20 mesos.

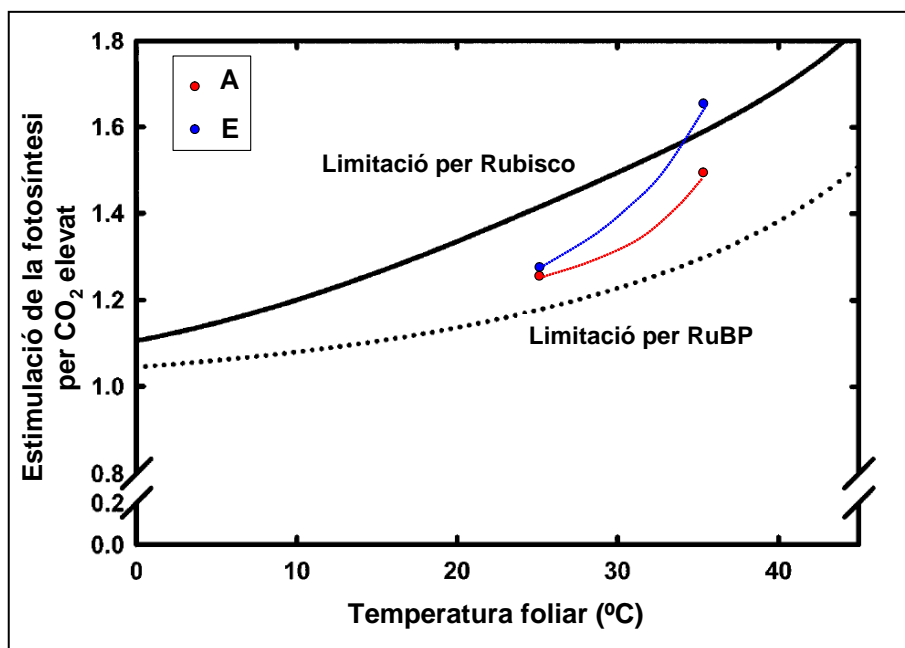
D'altra banda, a *Chamaerops humilis*, el CO<sub>2</sub> elevat va augmentar clarament l'eficiència en l'ús de l'aigua (WUE) a nivell de capçada, tant per efecte directe com a llarg termini (Taules 4.2.1 i 4.2.2). De manera instantània, la WUE va augmentar en resposta al CO<sub>2</sub> gràcies a un



increment de la fotosíntesi i una disminució de la conductància estomàtica. Però també va fer-ho a llarg termini a conseqüència d'una gran davallada de la conductància, malgrat l'aclimatació fotosintètica (Morison 1985, Drake *et al.* 1997, Saxe *et al.* 1998).

A *Cycas revoluta* la mesura del bescanvi de gasos de la capçada va posar de manifest una resposta al CO<sub>2</sub> elevat molt diferent a *Chamaerops humilis*. Els cicles diaris de fotosíntesi mesurats a 25°C (Fig. 4.2.4 i Taula 4.2.3) van ser totalment consistents amb les dades obtingudes a escala de fulla amb el Li-Cor 6400 (Fig. 4.2.27 i Taula 4.2.6). És a dir, no s'observa una *down-regulation* de la taxa de fotosíntesi, ja que les cinètiques diàries d'assimilació van ser iguals entre tractaments (A i E), tant a 400 com a 800 ppm de CO<sub>2</sub>. En canvi, sorprenentment, la taxa de fotosíntesi de la capçada de les plantes E a 35°C va patir una disminució en relació a les plantes A, les quals van mostrar una important *down-regulation* de la fotosíntesi per efecte indirecte del CO<sub>2</sub> a temperatura elevada (Fig. 4.2.4 i Taula 4.2.4). Sembla ser que la possible redistribució de nitrogen comentada anteriorment, va permetre mantenir el nitrogen foliar (Taula 4.2.11) a uns nivells no limitants per *Cycas revoluta* a 25°C (Zerihun *et al.* 2000). Però, per contra, sota condicions més desfavorables per la Rubisco, com una temperatura elevada, la reducció de nitrogen foliar sí que estaria produint una limitació, provocant una menor activitat de la Rubisco a les plantes E (Jacob *et al.* 1995, Rogers *et al.* 2001). Aquesta hipòtesi està reforçada pel fet que l'increment de fotosíntesi per efecte directe del CO<sub>2</sub> va ser similar entre tractaments a 25°C, mentre que a 35°C, l'augment de CO<sub>2</sub> va estimular més la fotosíntesi de les plantes E respecte a les A (Taula 4.2.3 i 4.2.4). Aquesta afirmació es basa en les prediccions del model de resposta a la temperatura de l'estímulació de la fotosíntesi per CO<sub>2</sub> elevat, elaborat per Farquhar *et al.* (1980) i complementat per Bernacchi *et al.* (2001, 2003; Fig. 5.2.1). De manera senzilla, el model pronostica un major estímul de l'efecte directe del CO<sub>2</sub> elevat sobre l'assimilació en resposta a la temperatura quan es dona una limitació per Rubisco que quan la limitació es troba a la regeneració de la RuBP. Així, l'increment és superior quan la Rubisco és limitant perquè l'elevat CO<sub>2</sub> incrementa la velocitat de carboxilació alhora que inhibeix competitivament l'oxigenació. En canvi, quan limita la RuBP només el darrer factor augmenta la fotosíntesi (Fig. 5.2.1). Per tant, l'explicació més probable de la disminució fotosintètica de les plantes E a 35°C seria una limitació a nivell d'activitat de la Rubisco. No obstant, queda per aclarir la causa concreta d'aquesta limitació a temperatures elevades en plantes de *Cycas revoluta* aclimatades a CO<sub>2</sub> elevat. Una possibilitat seria, a més d'una quantitat inferior d'enzim, l'existència de

problemes d'activació a través de la Rubisco activasa (Portis 2003). Segons Crafts-Brandner i Salvucci (2000) la disminució de l'activació de la Rubisco a elevades temperatures es podria donar per un elevat quocient ADP/ATP o bé per una taxa de desactivació de la Rubisco superior a la capacitat d'activació per la Rubisco activasa, encara que també podria ser a causa d'una limitació per utilització de trioses fosfat (Sharkey 1989). Les corbes A/PPFD de la capçada concorden amb aquestes dades (Fig. 4.2.8), és a dir, a 25°C la resposta a la llum no va presentar diferències entre tractaments, mentre que a 35°C va ser inferior al tractament E.



**Figura 5.2.1.** Increment teòric de fotosíntesi per efecte directe del CO<sub>2</sub> en resposta a la temperatura segons una limitació de la fotosíntesi per activitat de la Rubisco o per regeneració de RuBP. S'han representat els valors calculats per *Cycas revoluta* (adaptat de Long *et al.* 2004).

A totes les condicions de temperatura i concentració de CO<sub>2</sub>, la integral diària d'assimilació i, per tant, el balanç de carboni va ser molt superior a les plantes de *Cycas revoluta* crescudes a CO<sub>2</sub> elevat (Fig. 4.2.5). Així a 25°C, sense una *down-regulation* de la fotosíntesi i una major àrea foliar, les plantes E pràcticament van duplicar el guany net de carboni diari respecte a les plantes A (Taula 4.2.3). A 35°C el balanç de carboni va ser favorable a les plantes crescudes a CO<sub>2</sub> elevat, ja que la disminució de la fotosíntesi observada a les plantes E va ser sobradament compensada per l'augment acumulat d'àrea foliar (Taula 4.2.4), un fenomen habitual en la resposta al CO<sub>2</sub> a escala de *canopy* o ecosistema (Drake *et al.* 1997, Hamilton *et al.* 2001).

L'eficiència en l'ús de l'aigua (WUE) de *Cycas revoluta* a 25°C va augmentar a conseqüència de l'increment de CO<sub>2</sub>, ja que a aquesta temperatura el comportament fotosintètic va ser molt similar entre tractaments, mentre que la conductància estomàtica va ser inferior a les plantes E (Taula 4.2.3, Morison *et al.* 1998). En canvi, a 35°C només hi ha diferències en la WUE si comparem els tractaments a les respectives concentracions de CO<sub>2</sub> de creixement, és a dir A400 contra E800 (Taula 4.2.4).

### 5. 2. 3. RESPOSTA DE LA RESPIRACIÓ

S'han utilitzat tres metodologies independents (elèctrode d'O<sub>2</sub>, Li-Cor 6400 i cambres de la capçada) per estudiar la respiració. Cal remarcar que les dades obtingudes amb els diferents equips ofereixen en conjunt uns resultats molt similars sobre l'aclimatació de la taxa de respiració.

Les mesures amb l'elèctrode de Clark van permetre avaluar el funcionament de la cadena respiratòria a través del consum d'O<sub>2</sub>. Així, a *Chamaerops humilis* es va observar una lleugera disminució (no significativa) del consum d'O<sub>2</sub> a les plantes crescudes a CO<sub>2</sub> elevat (Fig. 4.2.29B). En canvi, la reducció de respiració observada a *Cycas revoluta* per efecte indirecte del CO<sub>2</sub> elevat va ser molt superior (26%, Fig. 4.2.30B). Es van obtenir uns resultats molt similars estudiant l'emissió de CO<sub>2</sub> de la fulla (Li-Cor 6400). És a dir, *Chamaerops humilis* va mostrar una lleugera reducció (no significativa) de la respiració (Fig. 4.2.29A), mentre *Cycas revoluta* va disminuir al voltant del 20% (Fig. 4.2.30A). Per tant, el quocient respiratori, que no va mostrar diferències entre tractaments a cap de les dues espècies, va ser molt proper a 1, indicant que el principal substrat respirat van ser els sucres (Figs. 4.2.29C i 4.2.30C, Tcherkez *et al.* 2003, Nogués *et al.* 2004).

Històricament, s'havia acceptat que de manera general la respiració es redueix a conseqüència d'un creixement a CO<sub>2</sub> elevat (Isdo i Kimball 1992, Azcón-Bieto *et al.* 1994, Amthor 1997, Drake *et al.* 1997, Curtis i Wang 1998, Norby *et al.* 1999). Però, en estudis posteriors s'ha demostrat que artefactes amb la [CO<sub>2</sub>] de mesura havien provocat, en molts casos, una subestima de la respiració a elevat CO<sub>2</sub> (Jahnke i Krewitt 2002, Pons i Welschen 2002, Davey *et al.* 2004). Per això, actualment s'accepta que l'efecte del CO<sub>2</sub> sobre la respiració depèn de cada espècie i que, per tant, la taxa de respiració pot disminuir, mantenir-se o fins i tot augmentar en resposta al CO<sub>2</sub> (Amthor 2000, Davey *et al.* 2004, González-Meler *et al.* 2004).

Per tant, no és un fet extraordinari que s'hagi donat una aclimatació a la baixa de la taxa de respiració a *Cycas revoluta*, mentre que pràcticament s'hagi mantingut a *Chamaerops humilis*.

A moltes espècies, la reducció de la respiració en plantes crecudes a CO<sub>2</sub> elevat està molt relacionada amb un descens del contingut en nitrogen (Tjoelker *et al.* 1999). Així, la disminució del contingut en nitrogen (Taules 4.2.11) hauria provocat una reducció de la taxa de respiració a *Cycas revoluta*. A *Chamaerops humilis* el descens de nitrogen no va ser tan acusat (Taula 4.2.8), i per tant la taxa de respiració s'hauria reduït en menor grau, sense donar diferències significatives. D'aquesta manera, en teixits amb baix nitrogen s'espera una reducció en la respiració de manteniment a causa d'una menor renovació proteica, però també una disminució en la respiració de creixement a causa dels menors costos de construcció que suposa una inferior síntesi proteica (Amthor 1989, Wullschleger *et al.* 1995, Poorter *et al.* 1997, van Iersel 2003). També cal tenir en compte que es podrien produir alteracions en la respiració per efecte del CO<sub>2</sub> sense que la taxa global es veiés afectada. Un exemple seria una variació en les proporcions de via citocròmica i alternativa (Ribas-Carbó *et al.* 1995). En aquest sentit, alguns estudis amb isòtops estables d'oxigen han mostrat que una reducció de la via citocròmica per efecte indirecte del CO<sub>2</sub> elevat pot ser compensada per una estimulació de l'activitat de la via alternativa, la qual cosa comportaria alteracions en l'eficiència respiratòria, però sense canvis importants en la taxa global (González-Meler i Taneva 2005).

Amb les cambres de bescanvi de gasos es van caracteritzar els efectes directes i indirectes del CO<sub>2</sub> elevat, en interacció amb la temperatura, sobre la respiració mitocondrial (R<sub>D</sub>) del conjunt del *canopy* al llarg de tota la nit. No es va observar a cap de les dues espècies un efecte directe rellevant del CO<sub>2</sub> elevat sobre la respiració. És a dir, dintre de cada tractament i temperatura, la taxa obtinguda a 400 ppm de CO<sub>2</sub> va ser similar a la mesurada a 800 ppm (Taules 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3 i 4.2.4). Múltiples estudis havien descrit una important reducció de la respiració a conseqüència d'un efecte directe del CO<sub>2</sub>, però com s'ha comentat anteriorment, a molts d'ells les diferències eren degudes a artefactes en la mesura (Jahnke i Krewitt 2002, Pons i Welschen 2002, Davey *et al.* 2004). Per això, malgrat que està acceptada una reducció de l'activitat enzimàtica a nivell respiratori per efecte directe del CO<sub>2</sub> elevat (González-Meler *et al.* 1996), actualment s'assumeix que no és massa important a nivell de teixit o de planta (González-Meler i Siedow 1999, Atkin i Tjoelker 2003, Davey *et al.* 2004, Gonzalez-Meler i Taneva 2005).

En relació a l'efecte indirecte del CO<sub>2</sub>, les mesures realitzades amb les cambres a 25°C van mostrar uns resultats consistents amb els obtinguts mitjançant l'elèctrode d'O<sub>2</sub> i el Li-Cor 6400. És a dir, a *Chamaerops humilis* es va donar una lleugera reducció de la respiració a les plantes E (14%, Taula 4.2.1), mentre que a *Cycas revoluta* va ser molt més important (33%, Taula 4.2.2). Les mesures a 35°C reflecteixen una clara estimulació de la respiració per efecte de la temperatura<sup>3</sup> (Amthor 1989, Atkin i Tjoelker 2003, Bunce 2004). Per això, en incrementar les taxes també van augmentar les diferències absolutes entre tractaments (Taules 4.2.2 i 4.2.4). D'aquesta manera, a *Chamaerops humilis* es va donar una reducció significativa de la respiració per efecte indirecte del CO<sub>2</sub> elevat només a 35°C. Sembla que la clau estaria a la reducció del nitrogen, que a temperatura elevada provocaria sobretot una disminució de la respiració de manteniment (Amthor 1989, Wullschleger *et al.* 1995, Poorter *et al.* 1997, van Iersel 2003), ja que a 35°C no augmenta el creixement d'aquesta espècie.

La integral diària de respiració en ambdues espècies va estar condicionada de manera més important per la quantitat de biomassa que per la taxa específica de respiració (Reich *et al.* 2006). Així, les plantes crescudes a CO<sub>2</sub> elevat respiren més, en termes absoluts, que les plantes A (Taules 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3 i 4.2.4).

Un altre fenomen interessant és la variació de la taxa de respiració al llarg de la nit. A l'inici del període de foscor es van observar taxes més elevades, que van anar disminuint suament durant la nit (Fig. 4.2.1 i 4.2.4). Es un fet bastant descrit i relacionat amb una quantitat superior de carbohidrats no estructurals a l'inici de la nit generats durant el període fotosintètic. El consum de sucres al llarg de la nit aniria disminuint la quantitat de substrat disponible per la respiració (Azcón-Bieto i Osmond 1983, Amthor 1989, Tcherkez *et al.* 2003, Davey *et al.* 2004).

Amb les cambres, també es va estimar la taxa de respiració mitocondrial a la llum (R<sub>L</sub>). Les dades mostren valors de R<sub>L</sub> molt inferiors respecte a la taxa de respiració a la foscor (R<sub>D</sub>), posant de manifest una clara inhibició de la respiració per efecte de la llum (Figs. 4.2.10 i 4.2.13). Aquest fenomen ha estat descrit prèviament en múltiples ocasions i es considera bastant acceptat (Kok 1948, Laisk 1977, Krömer 1995, Atkin *et al.* 2000, Tcherkez *et al.* 2005). En funció de l'espècie, la inhibició de la respiració per efecte de la llum pot oscil·lar entre un 0 i un 70% (Peisker i Apel 2001) i és provocada per una reducció tant a nivell de la

<sup>3</sup> El Q<sub>10</sub> va ser de 1.86 a *Chamaerops humilis* i 1.67 a *Cycas revoluta* (dades no mostrades).

glucòlisi com del cicle de Krebs (Krömer 1995, Atkin *et al.* 2000). Tcherkez *et al.* (2005) van quantificar, mitjançant tècniques de marcatge isotòpic amb  $^{12}\text{C}$  /  $^{13}\text{C}$ , que la disminució de la respiració a la llum es deu principalment a una inhibició sobre el cicle de Krebs, que es redueix en un 95%, mentre que el principal enzim de la glucòlisi regulat per llum, la piruvat deshidrogenasa (PDH), disminueix la seva activitat només en un 27%.

L'efecte del  $\text{CO}_2$  sobre la respiració a la llum és força desconegut, per això resulta molt interessant avaluar-lo. En el cas de *Chamaerops humilis*, la taxa de  $R_L$  no es va veure afectada pel  $\text{CO}_2$ , ni a curt ni a llarg termini (Fig. 4.2.10). La temperatura va ser l'únic factor que va alterar la  $R_L$  en aquesta espècie, d'igual manera als dos tractaments. Així, un augment de  $10^\circ\text{C}$  pràcticament va duplicar la taxa de  $R_L$  (Fig. 4.2.10). Es van observar certes diferències a causa del  $\text{CO}_2$  en el percentatge de respiració activa en presència de llum ( $R_L / R_D$ ). Les plantes crescudes a  $\text{CO}_2$  elevat van presentar un major  $R_L / R_D$ , és a dir, una menor inhibició de la respiració per efecte de la llum (Fig. 4.2.11). El mecanisme no està clar, però alguns autors atribueixen aquest augment a la major demanda d'esquelets de carboni que es dona amb condicions d'alt  $\text{CO}_2$  (Wang *et al.* 2001, Shapiro *et al.* 2004). Una altra possibilitat, postulada seria una disminució de la fotorespiració, que es considera un inhibidor de la respiració a la llum per dos motius. En primer lloc afectaria la glucòlisi, ja que el  $\text{NH}_3$ , subproducte de la descarboxilació fotorespiratòria del glicolat, regula a la baixa la PDH (Krömer 1995). En segon lloc, per inhibició dels enzims del cicle de Krebs, a través d'uns nivells elevats de NADH al mitocondri, causats per la descarboxilació fotorespiratòria del glicolat (Atkin *et al.* 2000).

A *Cycas revoluta* es va produir un efecte del  $\text{CO}_2$  elevat tant a curt termini com a llarg termini. Així, a  $25^\circ\text{C}$  la  $R_L$  va ser superior a 800 ppm que a 400 (Fig. 4.2.13), mentre que a  $35^\circ\text{C}$  no es va donar aquest efecte. L'augment de la  $R_L$  per efecte directe es podria justificar per una disminució de la fotorespiració a elevat  $\text{CO}_2$  (Krömer 1995, Atkin *et al.* 2000), així com per una superior demanda d'esquelets carbonats (Wang *et al.* 2001, Shapiro *et al.* 2004). No obstant, també està descrita una disminució de la  $R_L$  en una atmosfera enriquida en  $\text{CO}_2$  (Pinelli i Loretto 2003), la qual cosa genera molts dubtes sobre l'efecte directe del  $\text{CO}_2$  en la respiració a la llum. En contraposició, el  $\text{CO}_2$  elevat va mostrar un efecte indirecte negatiu sobre la  $R_L$ , no descrit anteriorment a la literatura. És a dir, es va donar una *down-regulation* de la taxa de  $R_L$  a les plantes E (Fig. 4.2.13). Pel que fa a la temperatura, la taxa de respiració a la llum va respondre positivament a un increment de 25 a  $35^\circ\text{C}$  (Fig. 4.2.13). El percentatge

de respiració activa a la llum de *Cycas revoluta* (31-45%) va ser bastant baix (Peisker i Apel 2001), molt inferior al de *Chamaerops humilis* (52-60%).

En definitiva, sembla que l'efecte indirecte del CO<sub>2</sub> sobre la respiració mitocondrial a la llum (R<sub>L</sub>) està molt lligat a la resposta de la respiració a la foscor (R<sub>D</sub>), segurament a través d'una limitació per nitrogen. Així, a *Chamaerops humilis*, espècie en què no es va produir pràcticament efecte del CO<sub>2</sub> sobre la R<sub>D</sub>, tampoc se n'observa sobre la R<sub>L</sub>, mentre que en el cas de *Cycas revoluta*, es va produir una *down-regulation* tant de la taxa de R<sub>D</sub> com de la R<sub>L</sub>.

#### 5. 2. 4. IMPLICACIONS SOBRE ELS PUNTS DE COMPENSACIÓ

Els punts de compensació estan influenciats tant per la fotosíntesi com per la respiració. Per això, l'estudi d'aquests paràmetres a diferents condicions ambientals permet integrar la resposta conjunta dels dos processos. Per tant, poden ser indicadors molt útils alhora d'avaluar l'aclimatació per efecte del CO<sub>2</sub> elevat.

El punt de compensació lumínic a *Chamaerops humilis* no es va veure afectat pel CO<sub>2</sub>, ni directa ni indirectament (Fig. 4.2.15, Lewis *et al.* 1999). Aquesta espècie va patir una marcada aclimatació fotosintètica a la baixa, mentre que la respiració va disminuir lleugerament, però de manera no significativa. Per això, sembla que el factor que més va influenciar el punt de compensació lumínic va ser la taxa de respiració, ja que petites disminucions respiratòries van poder compensar una gran davallada fotosintètica. D'altra banda, el punt de compensació lumínic es va veure modificat per la temperatura, de manera que a 35°C pràcticament es va duplicar (Fig. 4.2.15). L'augment dels processos respiratoris i la disminució fotosintètica associats a l'increment de temperatura van provocar que la fotosíntesi necessités molts més fotons per compensar la respiració i la fotorespiració. Aquest fet reforça la importància dels processos respiratoris sobre el punt de compensació lumínic en aquesta espècie.

A *Cycas revoluta* la taxa de respiració mitocondrial va ser molt inferior a la de *Chamaerops humilis* i, per això, en general, els punts de compensació lumínics van ser bastant més baixos (Fig. 4.2.16). D'altra banda, el creixement a CO<sub>2</sub> elevat va provocar una disminució (32%) del punt de compensació de llum a *Cycas revoluta* a una temperatura de 25°C (Fig. 4.2.16). A aquesta temperatura, les plantes A i E es van comportar fotosintèticament de la mateixa manera, per això, la reducció en el punt de compensació és deguda a un descens de la taxa

respiratòria per efecte a llarg termini del CO<sub>2</sub> elevat (Zhao *et al.* 2004). En canvi a 35°C, el punt de compensació és bastant superior a l'obtingut a 25°C, però sense diferències significatives entre plantes A i E (Fig. 4.2.16). L'absència d'efecte ens està indicant que la reducció fotosintètica de les plantes E a *Cycas revoluta* a 35°C va ser molt important, ja que la taxa de respiració no va augmentar excessivament amb la temperatura (Taules 4.2.3 i 4.2.4).

El punt de compensació de CO<sub>2</sub> ( $\Gamma$ ) reflecteix clarament el fenomen de l'aclimatació fotosintètica a *Chamaerops humilis* (Fig. 4.2.18). Així, augmenta per efecte indirecte del CO<sub>2</sub>, és a dir, les plantes E necessiten una concentració de CO<sub>2</sub> més elevada per a què l'activitat de la Rubisco sigui capaç d'igualar els processos respiratoris (mitocondrial i fotorespiració). El fet que la taxa de respiració de les plantes E va ser lleugerament inferior encara reforça més la hipòtesi d'una baixa activitat de la Rubisco (Bowes 1993, Drake *et al.* 1997, Long *et al.* 2004). Aquests resultats coincideixen plenament amb els obtinguts a escala de fulla mitjançant l'anàlisi de les corbes A/c<sub>i</sub> (Taula 4.2.5). D'altra banda, l'increment de temperatura va provocar un augment del  $\Gamma$ , afectant per igual als dos tractaments. Per això, a 35°C sota unes condicions més desfavorables i amb un increment de la respiració i la fotorespiració, la Rubisco necessita més concentració de substrat per compensar els processos respiratoris (Nie *et al.* 1995, Nakano *et al.* 1997, Moore *et al.* 1999, Long *et al.* 2004).

De la mateixa manera, a *Cycas revoluta*, el punt de compensació de CO<sub>2</sub> ( $\Gamma$ ) va estar molt condicionat per l'acció de la Rubisco. A 25°C no es van produir diferències entre tractaments, és a dir, no hi va haver efecte indirecte del CO<sub>2</sub>, ja que els dos tractaments van respondre fotosintèticament de la mateixa manera al CO<sub>2</sub> (Fig. 4.2.20). A 35°C, lògicament el punt de compensació de CO<sub>2</sub> va augmentar als dos tractaments. Però, sorprenentment, les plantes E van patir un increment del  $\Gamma$  molt superior al de les plantes A. Per tant, a temperatura elevada les plantes E van necessitar molt més CO<sub>2</sub> per aconseguir que la Rubisco treballés al mateix ritme que les plantes A, posant de manifest menor activitat fotosintètica a temperatures elevades causada per una aclimatació a CO<sub>2</sub> elevat (Ainsworth *et al.* 2003).

Les corbes de resposta de la fotosíntesi a la temperatura realitzades a *Chamaerops humilis* van permetre obtenir l'òptim tèrmic i el punt de compensació (Fig. 4.2.21). Pel que fa a l'òptim, es pot observar un petit increment a causa d'un efecte directe del CO<sub>2</sub> elevat, i una lleugera reducció per efecte indirecte. El punt de compensació tèrmic va ser inferior a les plantes crescudes a CO<sub>2</sub> elevat, a causa de la *down-regulation* de la fotosíntesi (Fig. 4.2.22). En canvi,



un increment instantani de la  $[CO_2]$  va augmentar la temperatura a què es va anul·lar la fotosíntesi, en la mateixa proporció als dos tractaments (A i E).

A *Cycas revoluta* la corba de resposta de la fotosíntesi a la temperatura mostra com a temperatures inferiors a l'òptim no hi ha diferències entre tractaments (A i E, Fig. 4.2.23). Però a partir dels 30°C, les plantes E van mostrar una gran sensibilitat a l'increment de temperatura i, fins i tot a una concentració de 800 ppm de  $CO_2$ , la seva fotosíntesi va disminuir molt més ràpidament que a les plantes A a 400 ppm. Per això, el punt de compensació tèrmic va ser diferent entre tractaments (Fig. 4.2.24). Les plantes crescudes a  $CO_2$  ambiental van tenir un punt de compensació tèrmic més alt que les plantes E. Però a més, a les plantes A, una concentració de 800 ppm de  $CO_2$  encara va augmentar de manera significativa la temperatura de compensació. En canvi, sorprenentment, a les plantes E més enllà dels 38°C es va perdre l'efecte directe i positiu del  $CO_2$  sobre la fotosíntesi. Per això, el punt de compensació tèrmic a les plantes E va ser igual a 400 que a 800 ppm de  $CO_2$  (Fig. 4.2.24). Aquesta manca de resposta positiva de la fotosíntesi a 800 ppm és un resultat interessant, que suggereix l'existència de problemes d'activació associada a la menor activitat de la Rubisco observada a elevades temperatures en plantes de *Cycas revoluta* aclimatades a  $CO_2$  elevat (Farquhar *et al.* 1980, Bernacchi *et al.* 2001, Bernacchi *et al.* 2003, Long *et al.* 2004). En cas de produir-se, aquests problemes en l'activació s'afegirien als produïts per una disminució de la quantitat d'enzim, tal i com indicava la disminució de nitrogen (Taula 4.2.11). Malgrat que els resultats són molt preliminars, indicarien que de no existir aquests problemes d'activació, la Rubisco present, amb independència de la seva concentració, hauria de respondre positivament a un increment de la concentració de  $CO_2$  (Farquhar *et al.* 1980, Bernacchi *et al.* 2001, Bernacchi *et al.* 2003). Els resultats obtinguts obren la possibilitat a futurs experiments per aclarir quins mecanismes estan implicats en aquesta disminució d'activitat de la Rubisco.

### 5. 3. RESPOSTA DE LA PRODUCCIÓ DE BIOMASSA AL CO<sub>2</sub> ELEVAT

*Chamaerops humilis* i *Cycas revoluta* són dues espècies de creixement molt lent. Per això va resultar molt interessant sotmetre-les a una elevada concentració atmosfèrica de CO<sub>2</sub> per tal d'estudiar la resposta de la producció de biomassa enfront d'aquest estímul pel creixement. Així, en general, el creixement d'ambdues espècies es va veure estimulat per una exposició a mig i llarg termini a elevat CO<sub>2</sub>. No obstant, l'anàlisi de la producció de biomassa va revelar fortes diferències entre espècies, tant en la cinètica intrínseca de creixement com en les característiques de la resposta al CO<sub>2</sub> elevat.

Als 5 mesos d'aplicació, el CO<sub>2</sub> elevat va produir un increment de biomassa bastant similar en ambdues espècies, 25% a *Chamaerops humilis* i 23% a *Cycas revoluta* (Figs. 4.1.1 i 4.1.2). Molts estudis coincideixen amb aquest augment del creixement pel CO<sub>2</sub> elevat (Drake *et al.* 1997, Long *et al.* 2004, Nowak *et al.* 2004). Després d'una exposició a llarg termini (20 mesos), el CO<sub>2</sub> elevat va incrementar notablement la millora sobre la producció (Figs. 4.1.1 i 4.1.2), encara que de manera molt superior a *Cycas revoluta* (152%) respecte a *Chamaerops humilis* (81%). Està àmpliament acceptat que la principal causa de l'estímul del CO<sub>2</sub> elevat sobre el creixement és un augment directe de la fotosíntesi (Long 1991, Drake *et al.* 1997, Long *et al.* 2004, Nowak *et al.* 2004). Aquesta afirmació es veu confirmada observant les dades de bescanvi de gasos, les quals van mostrar en ambdues espècies un increment de la fotosíntesi per efecte directe del CO<sub>2</sub>, tant per unitat d'àrea foliar (Fig. 4.2.25 i 4.2.27) com a escala de planta (Fig. 4.2.1 i 4.2.4). L'acumulació progressiva de biomassa i un efecte de retroalimentació positiva de l'àrea foliar sobre la fotosíntesi justifiquen que s'amplifiquin amb el temps les diferències de biomassa entre les plantes crescudes a CO<sub>2</sub> elevat i ambiental (Jones 1992, Lloyd i Farquhar 1996, Norby *et al.* 1999, Larcher 2003, Davey *et al.* 2006). Ara bé, el fet que l'augment de biomassa entre espècies fos igual als 5 mesos i molt diferent als 20, posa de manifest la implicació d'algun altre mecanisme que modifica el comportament a llarg termini.

En aquest sentit, la regulació fotosintètica a la baixa en resposta al CO<sub>2</sub> elevat observada a *Chamaerops humilis* seria un fenomen que explicaria consistentment aquests resultats de biomassa. Així, la clau de la millora productiva en aquesta espècie es trobaria en l'aprofitament dels beneficis del CO<sub>2</sub> elevat durant els primers mesos de tractament, en absència d'aclimatació fotosintètica (Norby *et al.* 1999). A les etapes posteriors, es va

continuar donant un efecte positiu del CO<sub>2</sub> sobre el creixement, ja que les plantes E van presentar una integral de fotosíntesi diària per planta superior, però només a conseqüència d'una major àrea foliar. Per això, el BER (estímul del CO<sub>2</sub> elevat sobre la producció de biomassa) va reduir la seva velocitat d'increment a partir del novè mes, tal i com mostra clarament la figura 4.1.7, a causa de l'aclimatació fotosintètica (Norby *et al.* 1999, Poorter i Pérez-Soba 2001, Ainsworth *et al.* 2002). Aquest fenomen d'alentiment també es veu reflectit al RGR (Taula 4.1.4), que va disminuir en ambdós tractaments als 20 mesos en relació als 5, encara que de manera molt més important a les plantes E. Malgrat això, fins i tot al final de l'experiment, el RGR de les plantes crescudes a CO<sub>2</sub> elevat va ser superior al de les plantes A, mostrant una relació positiva amb la taxa de fotosíntesi per àrea (Poorter i Navas 2003), més elevada a les plantes E a 800 ppm que la de les plantes A a 400 ppm.

A *Cycas revoluta*, en canvi, la *down-regulation* de la fotosíntesi per efecte del CO<sub>2</sub> elevat no és gens clara. Així, la resposta fotosintètica només sembla veure's regulada a la baixa en condicions desfavorables de temperatura (Fig. 4.2.4). Diversos estudis confirmen l'existència d'espècies que no han presentat una aclimatació fotosintètica a la baixa pel CO<sub>2</sub> elevat (Bartak *et al.* 1999, Davey *et al.* 2006). Després de 20 mesos, la fotosíntesi per àrea mesurada a les respectives concentracions de CO<sub>2</sub> de creixement (E800 contra A400) va ser superior a les plantes E en relació a les plantes A sempre que la temperatura va ser inferior a 36°C (Fig. 4.2.23). A més a més, com que les plantes crescudes a CO<sub>2</sub> elevat van presentar més del doble d'àrea foliar, l'assimilació diària per planta, lògicament, va augmentar molt a conseqüència del CO<sub>2</sub> elevat (E800 contra A400). Així, a 25°C va augmentar un 128% mentre que a 35°C un 116% (Taulas 4.2.3 i 4.2.4). El progressiu augment d'àrea foliar associat a l'absència general d'aclimatació fotosintètica al CO<sub>2</sub> expliquen la cinètica de creixement a llarg termini (Calfapietra *et al.* 2001, Davey *et al.* 2006). Per això, a *Cycas revoluta* el BER va mantenir una taxa d'increment constant al llarg dels 20 mesos d'experiment (Fig. 4.1.7, Poorter i Pérez-Soba 2001). El RGR a *Cycas revoluta* també va disminuir amb el temps, però, a diferència de *Chamaerops*, la disminució va ser superior a les plantes A, mostrant un clar efecte positiu del CO<sub>2</sub> sobre el creixement després de 20 mesos.

La respiració és un peça clau del metabolisme vegetal, per això l'efecte del CO<sub>2</sub> elevat sobre aquest procés pot tenir un impacte molt rellevant sobre el balanç de carboni de la planta (Azcón-Bieto *et al.* 1994, Drake *et al.* 1999, González-Meler i Taneva 2005). En aquest sentit, la disminució de la respiració observada a *Cycas revoluta* en resposta al CO<sub>2</sub> hauria contribuït

a incrementar el guany net de carboni diari de les plantes E (Taulas 4.2.3 i 4.2.4), el qual es podria haver traduït en un augment del creixement (van Iersel 2003, Gifford 2003). En canvi, la manca d'una aclimatació a la baixa de la taxa respiratòria a *Chamaerops humilis* hauria provocat que el principal efecte sobre el creixement fos degut a la resposta fotosintètica (Gifford 2003).

D'altra banda, una anàlisi bastant exhaustiva de la producció de biomassa va oferir informació addicional sobre els fenòmens anteriorment descrits. Així, l'increment de biomassa observat a *Chamaerops humilis* després de 5 mesos de CO<sub>2</sub> elevat, va ser degut a un increment del pes sec de fulles i d'arrels (Fig. 4.1.1). L'augment de biomassa foliar va ser moderat i provocat exclusivament per un increment del pes específic foliar (SLW, Pearcy i Björkman 1983, Long *et al.* 2004) i no d'àrea (Taula 4.1.1). En canvi, les arrels van ser l'òrgan amb l'increment més important de biomassa per efecte del CO<sub>2</sub> (BassiriRad *et al.* 1997, Will i Teskey 1997, Nowak *et al.* 2004). Així, el CO<sub>2</sub> elevat va alterar les relacions de biomassa entre fraccions, de manera que va augmentar el RWR (relació de pes radicular) i el *Root / Shoot* (Bazzaz *et al.* 1993, Callaway *et al.* 1994, BassiriRad *et al.* 1997, Will i Teskey 1997). Als 20 mesos, en canvi, no es van observar diferències entre tractaments pel que fa al repartiment de biomassa entre els òrgans de la planta (Taula 4.1.1), però a totes les fraccions estudiades el pes sec va ser superior a les plantes E. El SLW va presentar valors molt alts, posant de manifest uns elevats costos de construcció i va ser lleugerament superior a les plantes E. Aquestes dades suggereixen que l'increment de biomassa ocasionat per una superior fotosíntesi a CO<sub>2</sub> elevat es va acumular transitòriament a les fulles i les arrels que, posteriorment, es va repartir homogèniament entre tots els òrgans.

A *Cycas revoluta*, també s'observa als 5 mesos un repartiment desigual de l'increment de matèria seca que va ocasionar el CO<sub>2</sub> elevat entre els diferents òrgans. Així, les plantes E només van mostrar una superior biomassa al tronc i a les arrels gruixudes, encara que sense produir-se en cap modificació als índex de repartiment de biomassa (Taula 4.1.2). En aquest punt de mesura, es va estudiar el creixement foliar d'aquesta espècie (Taula 4.1.3). Aquest creixement es va donar només per aparició de noves fulles i no per expansió de les ja existents. Així, durant 5 mesos les fulles velles no van mostrar pràcticament creixement, ni en pes sec ni en àrea foliar (Taula 4.1.3). A més, les fulles noves van aparèixer pocs dies abans del mostreig, van brotar totes a la vegada i es van desenvolupar molt ràpidament. L'única variació entre tractaments que es va produir a les fulles, es va donar a les fulles noves, que

van tenir un major pes específic foliar (SLW) a les plantes crescudes a CO<sub>2</sub> elevat (Pearcy i Björkman 1983, Long *et al.* 2004). De la mateixa manera que a *Chamaerops*, als 20 mesos el CO<sub>2</sub> elevat va incrementar el pes sec de tots els òrgans de *Cycas revoluta*, però sense afectar la partició de biomassa entre les diferents fraccions vegetals (Davey *et al.* 2006). Així, en aquesta espècie l'augment de fotosíntesi associat al CO<sub>2</sub> elevat no va comportar canvis de biomassa foliar a curt termini, però sí en altres òrgans. Aquestes dades i el fet que a llarg termini les fulles manifestessin un increment del creixement indicarien que gran part del carboni assimilat per les fulles és exportat a altres òrgans, i que posteriorment seria utilitzat per la formació de noves fulles.

Dintre del rang de productivitat vegetal, *Chamaerops humilis* i *Cycas revoluta* tenen taxes de creixement similar, i com s'ha dit anteriorment, es poden considerar plantes de creixement molt lent (Poorter 1998). No obstant, la cinètica de creixement que van mostrar al llarg de l'experiment va ser molt diferent. A *Chamaerops humilis* l'increment de biomassa va ser progressiu i constant (Fig. 4.1.5). En canvi, *Cycas revoluta* va mostrar un creixement discontinu, a polsos. Així, a la figura 4.1.6 es pot observar com durant els primers 6 mesos d'experiment es van donar 2 períodes d'acceleració i desacceleració del creixement. Aquests patrons de creixement s'ajusten a les dues estratègies definides per Körner (1999) en plantes alpines: espècies de creixement continu (*continuous growth plants*) i espècies de creixement a polsos (*pulsed growth plants*). Així, en l'àmbit de les plantes de creixement lent de l'àrea mediterrània també apareixen aquestes estratègies adaptatives. Per tant, resulten dues possibilitats conservadores que els permetrien créixer d'una manera segura.

L'estímul del CO<sub>2</sub> elevat sobre la producció de biomassa (BER) va mostrar una relació negativa amb la taxa de creixement relatiu (RGR, Fig. 4.1.8). És a dir, les plantes que més van respondre al CO<sub>2</sub> van ser les plantes de menor creixement. Aquest fenomen es va donar tant a nivell interespecífic com a nivell intraespecífic. Comparant entre espècies, a *Cycas revoluta*, amb un RGR inferior, la producció de biomassa es va veure més estimulada pel CO<sub>2</sub> elevat que a *Chamaerops humilis*. Aquesta relació interespecífica ha estat descrita prèviament (Biel *et al.* 2003) i podria indicar que les espècies de menor creixement tindrien menys problemes per gestionar l'aport extra de biomassa que genera el CO<sub>2</sub> elevat i així poder evitar l'aclimatació fotosintètica (Davey *et al.* 2006). En canvi, altres estudis amb un rang més ampli de RGR, que inclouen espècies de creixement ràpid, mostren una relació positiva entre el RGR i el BER (Poorter i Pérez-Soba 2001). Pel que fa a l'efecte intraespecífic, sembla molt

relacionat amb l'edat. Així, les plantes més joves presentarien molta més predisposició al creixement i, per tant, tindrien un RGR més elevat i una superior capacitat de resposta al CO<sub>2</sub> elevat, que s'anirien perdent amb el temps (Poorter i Pérez-Soba 2002).

Finalment, cal fer referència a les baixes taxes de creixement obtingudes a *Chamaerops humilis* i *Cycas revoluta*. Tot apunta a què les causes d'aquest comportament són intrínseques. Així, a partir del conjunt de mesures realitzades, el creixement molt lent d'ambdues espècies es podria justificar per unes baixes taxes de fotosíntesi, fins i tot sota condicions òptimes, així com per uns costos de construcció molt elevats (Lloyd i Farquhar 1996, Poorter *et al.* 1997, Poorter i Pérez-Soba 2001).

#### 5. 4. GESTIÓ DEL CARBONI ASSIMILAT EN PLANTES DE CREIXEMENT LENT

Durant tot el període de cultiu a hivernacle (20 mesos), les plantes dels diferents tractaments (A i E) van estar exposades a aires amb una composició isotòpica del carboni ( $\delta^{13}\text{C}$ ) diferent (Taula 4.3.1). Així, la  $\delta^{13}\text{C}$  de l'aire del mòdul ambiental va ser de  $-14.0\text{‰}$  mentre que la de l'elevat va ser de  $-19.2\text{‰}$ . Per tant, durant l'experiment les plantes de cada tractament van assimilar un aire amb una signatura isotòpica diferent. Com s'ha comentat a l'apartat 5.1, les dades de discriminació isotòpica del carboni mesurada *on line* ( $\Delta_o$ , Fig. 4.3.4) mostren que hi va haver fraccionament isotòpic durant l'assimilació de  $\text{CO}_2$ . Dintre de cada espècie, els dos tractaments es van tenir una discriminació isotòpica similar, és a dir, no van discernir de diferent manera respecte al  $\text{CO}_2$  que assimilaven. La manca de diferències entre tractaments sembla lògica, ja que està descrit un manteniment del quocient del  $c_i/c_a$  en una atmosfera amb  $\text{CO}_2$  elevat (Evans *et al.* 1986, Mott 1988, Drake *et al.* 1997, Long *et al.* 2004). Per això, al mòdul elevat, que va tenir una  $\delta^{13}\text{C}$  de l'aire modificada, la incorporació de  $\text{CO}_2$  va provocar un marcatge isotòpic dels teixits de les plantes E.

A conseqüència d'aquesta discriminació, la composició isotòpica del carboni de la matèria orgànica ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$ ) va presentar valors empobrits en  $^{13}\text{C}$  respecte a l'aire de creixement (Taula 4.3.2 i 4.3.3). A les plantes crescudes a  $\text{CO}_2$  elevat, és a dir, les sotmeses al marcatge isotòpic de llarga durada, la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  va estar més empobrida que a les plantes A, però no tant com caldria esperar tenint en compte la  $\delta^{13}\text{C}$  de l'aire de creixement ( $-19.2\text{‰}$ ) i la discriminació isotòpica mesurada *on line* ( $\Delta_o$ ). Així, a *Chamaerops humilis* com la  $\Delta_o$  va ser de  $15.2\text{‰}$ , s'esperaria una  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  a les plantes marcades s'aproximés  $-34.4\text{‰}$ , mentre a *Cycas revoluta* ( $\Delta_o = 14.1\text{‰}$ ) hauria de ser de  $-33.3\text{‰}$ , en el cas que tot el carboni fos de nova assimilació. Per tant, aquest empobriment inferior al màxim esperat va ser degut a la presència de carboni antic, és a dir, present als teixits de les plantes abans de l'inici del marcatge i no tan empobrit, ja que la  $\delta^{13}\text{C}$  de l'aire ambiental va ser de  $-14.0\text{‰}$  (Tcherkez *et al.* 2003, Nogués *et al.* 2004).

L'anàlisi de la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  de les diferents fraccions va permetre estudiar el repartiment del carboni assimilat per les fulles entre els diferents òrgans de la planta. Així, després de 5 mesos a *Chamaerops humilis* el carboni marcat (més negatiu) va aparèixer clarament a totes les fraccions, però sobretot a les arrels (Taula 4.3.2). Per tant, es reafirma la hipòtesi que les arrels són un important *sink* del carboni assimilat per les fulles, ja que van registrar el major

creixement i el major canvi de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  (Kouchi i Yoneyama 1984, Maillard *et al.* 1994, Badeck *et al.* 2005). Als 20 mesos, les  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  es van mantenir, indicant que a llarga el repartiment de la biomassa va ser uniforme. A *Cycas revoluta* els resultats són també interessants, ja que el marcatge no es va produir per igual a tots els òrgans (Taula 4.3.3). Als 5 mesos, la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  de les fulles velles de les plantes E pràcticament no va variar en relació a les plantes no marcades, mostrant, per tant, una molt petita quantitat de carboni nou en aquests teixits. La resta de fraccions van presentar un marcatge superior, especialment els troncs i les fulles noves (aparegudes en bloc pocs dies abans del mostreig). Aquestes dades semblen confirmar que en aquesta espècie el carboni assimilat per les fulles s'exporta majoritàriament a altres òrgans, especialment el tronc, i que posteriorment aquest carboni és remobilitzat per la formació de noves fulles (Cliquet *et al.* 1990b). D'altra banda, el fort increment de biomassa de les arrels gruixudes i el canvi molt lent de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  suggereix que serien un important *pool* de reserva de carboni amb una baixa taxa de renovació (Cliquet *et al.* 1990a). Als 20 mesos, la major part de pes sec foliar va correspondre a biomassa de nova formació, la qual cosa explica el valor de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  observat (Taula 4.3.3). Per tant, les dades de biomassa i de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  apunten que a llarg termini el repartiment del carboni nou es dona de manera uniforme entre els diferents òrgans.

Mitjançant el marcatge de curta durada es va estudiar l'assimilació del carboni per les fulles, així com l'acumulació en els teixits foliars. Tal i com s'ha explicat anteriorment, en ambdues espècies la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  de les fulles abans del marcatge de curta durada va presentar diferències entre tractaments (A i E) a conseqüència del marcatge de llarga durada (Figs. 4.3.5 i 4.3.6). A *Chamaerops humilis*, es va produir un gran canvi en la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  de les fulles de les plantes A després de 4 dies de marcatge. Així, el carboni assimilat durant el marcatge, quantificat amb les cambres de bescanvi gasós, va romandre temporalment a les fulles, ja que després de 30 dies de desmarcatge, la pràctica totalitat d'aquest carboni va deixar d'estar present a les fulles. Per tant, sembla que les fulles de *Chamaerops humilis* són un òrgan on s'acumula de manera molt important el carboni recentment assimilat, i pel que indiquen les dades de desmarcatge, seria de manera transitòria. D'altra banda, a *Cycas revoluta*, es va donar una absència de marcatge a les fulles de les plantes A al final del període de marcatge (Fig. 4.3.6), fins i tot en duplicar la durada (8 dies), la qual cosa confirma que el carboni assimilat per les fulles no s'acumularia a curt termini en aquests teixits.



Els fotoassimilats produïts durant l'assimilació del carboni a les fulles poden seguir principalment tres camins: ser respirats, emmagatzemar-se o bé ser exportats a altres òrgans (Cliquet *et al.* 1990a). En aquest context, el marcatge isotòpic va permetre estudiar la respiració del carboni recentment assimilats per les fulles, l'acumulació de carboni nou i l'exportació a altres òrgans.

Abans del marcatge curt, la  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  respirat de les plantes no marcades (A) tant a *Chamaerops humilis* com a *Cycas revoluta* va estar enriquida en  $^{13}\text{C}$  en relació a la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  de les fulles. Per tant, es va observar una discriminació isotòpica del carboni positiva durant la respiració al voltant del +6‰ (Figs. 4.3.5, 4.3.6, 4.3.7 i 4.3.8, Ghashghaie *et al.* 2003, Tcherkez *et al.* 2003, Nogués *et al.* 2004). Recentment s'ha descrit aquest fenomen a diverses espècies de plantes  $\text{C}_3$ , tant herbàcies com arbustives i arbòries (Xu *et al.* 2004), però és la primera vegada que s'observa aquest fenomen en gimnospermes (*Cycas revoluta*). Tcherkez *et al.* (2003) van proposar que la discriminació isotòpica durant la respiració pot ser explicada per diferents motius. En primer lloc, per la naturalesa química del substrat utilitzat per la respiració (sucres, àcids orgànics, lípids o proteïnes). Per exemple, quan es respiren exclusivament sucres la composició isotòpica del  $\text{CO}_2$  respirat es troba al voltant -20‰, mentre que en el cas dels lípids la  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  respirat disminueix fins a -30‰ (Duranceau *et al.* 1999). En segon lloc, s'ha postulat una discriminació d'alguns enzims implicats en la respiració, com la piruvat deshidrogenasa (PDH, De Niro i Epstein 1977). I finalment, a causa d'una distribució no uniforme del  $^{13}\text{C}$  en la molècula de glucosa, és a dir, el  $^{13}\text{C}$  és més abundant a les posicions 3 i 4 de les hexoses, diana de trencament de la PDH (Tcherkez *et al.* 2003). D'altra banda, la  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  respirat obtinguda així com un valor de quocient respiratori (RQ) proper a 1 van indicar que els sucres van ser el substrat principal utilitzat per la respiració en aquestes espècies (Tcherkez *et al.* 2003; Nogués *et al.* 2004).

També es va estudiar la participació del carboni recentment assimilats (nou) en la respiració en contraposició al present prèviament als teixits de la planta (vell). Aquesta qüestió es va abordar mitjançant la utilització d'isòtops estables de carboni com a traçadors. Per a aquest efecte es van subministrar a les plantes uns 400 mmol C  $\text{m}^{-2}$  amb una  $\delta^{13}\text{C}$  empobrida en relació a l'aire ambiental (-22.9‰). L'empobriment en la  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  respirat després d'aquest marcatge va indicar que el carboni assimilats recentment va estar implicat a la respiració (Figs. 4.3.7 i 4.3.8). No obstant això, aquestes figures mostren que en aquestes espècies la major part del carboni oxidat durant la respiració va correspondre a carboni

present als teixits prèviament al marcatge (carboni vell, Fig. 4.3.9). Així, el % de carboni nou present a la respiració va ser molt baix a *Cycas revoluta* (17%), però encara més baix a *Chamaerops humilis* (7%), la qual cosa contrasta amb els resultats publicats fins ara en altres espècies vegetals com *Phaseolus vulgaris* (50%, Nogués *et al.* 2004) o *Fagus sylvatica* (58%, Nogués *et al.* 2006a).

El conjunt d'aquests resultats suggereix que a la naturalesa podrien existir dos fisiotips respiratoris ben diferenciats. En primer lloc tindríem unes plantes més conservadores, és a dir que restringeixen la renovació del *pool* respiratori i afavoreixen el reciclatge de reserves, com *Chamaerops humilis* i *Cycas revoluta*. Probablement, aquesta estratègia respiratòria més conservadora estigui relacionada amb els limitants ambientals. Així, ja que aquestes espècies de creixement lent no respiren immediatament la major part del carboni que han assimilat, podrien ser anomenades “plantes de baixa renovació respiratòria”. D'altra banda, altres espècies com *Phaseolus vulgaris* i *Fagus sylvatica* inverteixen més carboni nou en la respiració. Aquestes espècies de creixement ràpid, on al voltant del 50% del CO<sub>2</sub> respirat prové del recentment assimilat, podrien denominar-se “plantes d'elevada renovació respiratòria” (Nogués *et al.* 2006b). Evidentment, per validar aquesta hipòtesi són necessaris futurs experiments sobre la biodiversitat de la resposta de la respiració vegetal.

A partir de la integració de dades de biomassa, bescanvi de gasos i isòtops estables s'ha elaborat un model de la gestió del carboni recentment assimilat a *Chamaerops humilis* (Fig. 5.4.1) i a *Cycas revoluta* (Fig. 5.4.2). Es tracta d'un model simplificat on es considera que tot el carboni és assimilat per les fulles, i que aquest carboni es reparteix entre tres processos: respiració, acumulació o exportació. Les quantitats s'han referit en base al carboni nou assimilat (100%), de manera que s'ha estimat el percentatge de carboni nou que es destina a cadascun dels tres processos.

La quantitat relativa de carboni recentment assimilat que es va consumir a la respiració es va calcular a partir de les dades d'assimilació i respiració, així com del percentatge de carboni recentment assimilat present a la respiració. És a dir, en el cas de *Chamaerops humilis*, la integral de carboni respirat va ser un 12% de l'assimilat (Taula 4.2.1), mentre que únicament un 7% del carboni respirat provenia del recentment assimilat (Fig. 4.3.9). Per això, només al voltant d'un 1% del carboni recentment assimilat (nou) es perd a través de la respiració (Fig. 5.4.1). Fent els càlculs de la mateixa manera, es va obtenir que a *Cycas revoluta* l'emissió de

carboni nou per la respiració va ser inferior al 2% de l'assimilat (Fig. 5.4.2), ja que la respiració va suposar un 9% respecte a la integral de fotosíntesi (Taula 4.2.3) i només un 17% del CO<sub>2</sub> respirat va ser de recent assimilació (Fig. 4.3.9).

L'estimació del percentatge de carboni recentment assimilat que s'acumula a les fulles es va realitzar a partir de les dades obtingudes als 5 mesos de biomassa i de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  de les fulles, així com de la  $\Delta_o$  i la  $\delta^{13}\text{C}$  de l'aire de marcatge. En primer lloc es va calcular l'increment de biomassa de la planta al tractament E durant els 5 mesos de marcatge (Taula 4.2.1 i 4.2.2), valor que es va considerar proporcional a la quantitat de carboni assimilat durant el marcatge. D'altra banda, es va calcular el percentatge de la biomassa foliar present als 5 mesos que es va formar amb el carboni assimilat durant el marcatge. Es va obtenir aplicant una variant de l'equació simplificada per Nogués *et al.* (2004) i descrita a l'apartat (3.7.2.4).

$$\% C \text{ nou fulles} \approx 100 \cdot \frac{\delta_{\text{MOT } f} - \delta_{\text{MOT } b}}{\delta_L - \Delta_o - \delta_{\text{MOT } b}}$$

$\delta_{\text{MOT } f}$ :  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  de les fulles de plantes E als 5 mesos de marcatge (‰, Taula 4.3.2 i 4.3.3)

$\delta_{\text{MOT } b}$ :  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  de les fulles de les plantes A als 5 mesos de cultiu (‰, Taula 4.3.2 i 4.3.3)

$\delta_L$ :  $\delta^{13}\text{C}$  del CO<sub>2</sub> de l'aire de marcatge (‰, Taula 4.3.1)

$\Delta_o$ : discriminació fotosintètica del carboni mesurada *on line* (‰, Fig. 4.3.4)

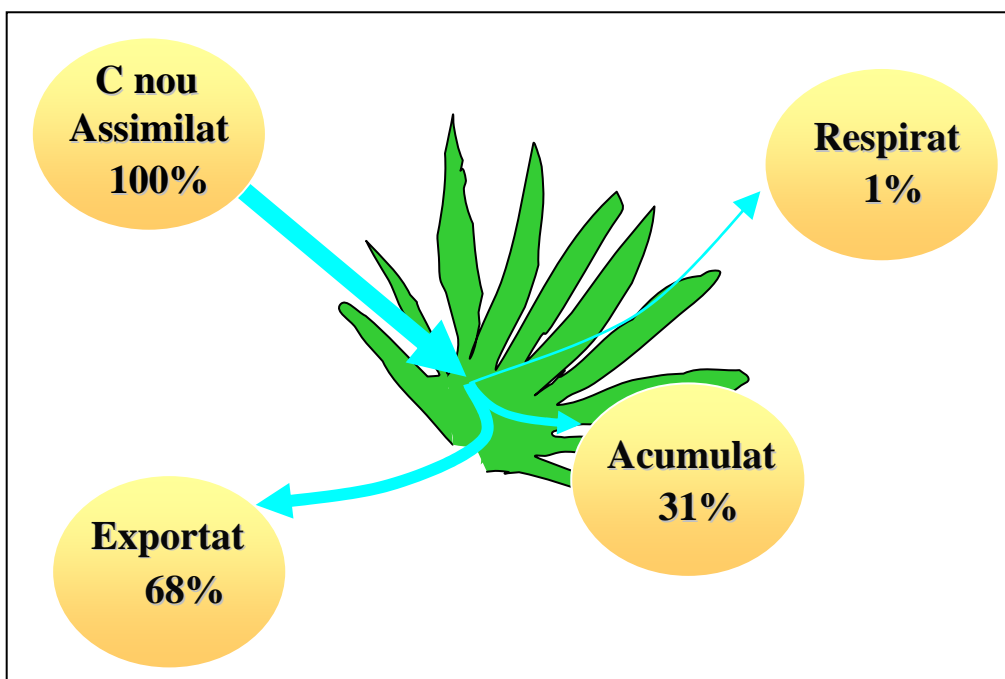
A partir del pes sec de fulles del tractament E (PS fulles, Figs. 4.1.1 i 4.1.2) i el % de carboni nou calculat, es va obtenir un valor absolut proporcional al carboni marcat acumulat a les fulles. Així, el percentatge de carboni nou acumulat a les fulles durant el marcatge es va obtenir de la següent manera:

$$\% C \text{ acumulat fulles} \approx 100 \cdot \frac{\text{PS fulles} \cdot \% C \text{ nou fulles}}{\text{Increment biomassa}}$$

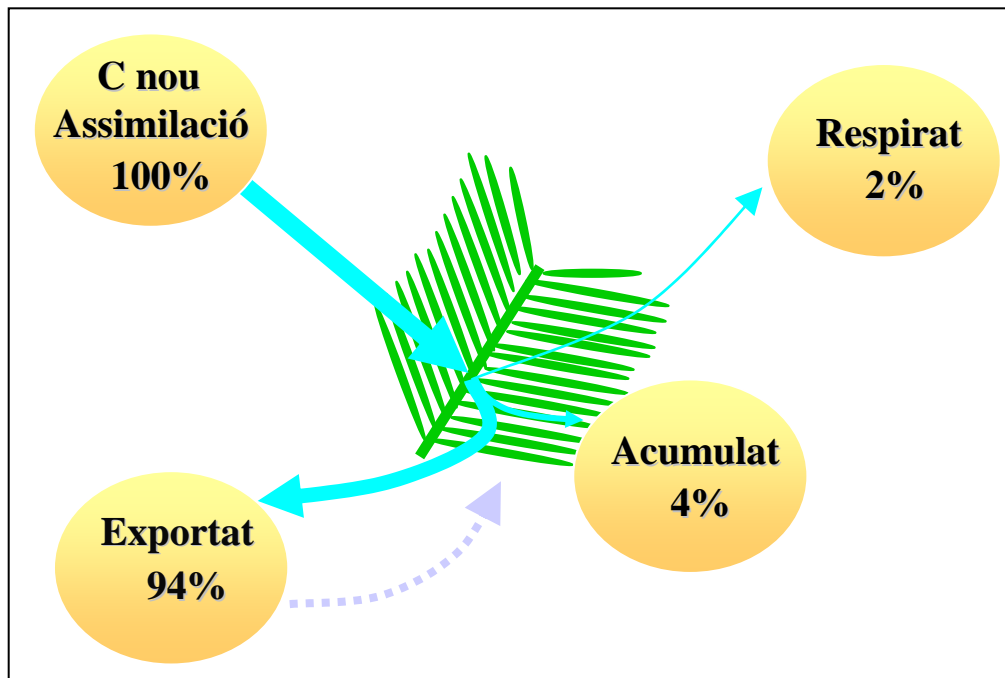
A *Chamaerops humilis*, als 5 mesos, del total de carboni de la fulla aproximadament un 65% va presentar marcatge. Per tant, el percentatge calculat de C acumulat a les fulles va ser del 31% (Fig. 5.4.1). A *Cycas revoluta*, la  $\delta^{13}\text{C}_{\text{MOT}}$  de les fulles del tractament E pràcticament no va presentar marcatge (Taula 4.3.3). Per això només un 12% del carboni foliar va

correspondre a carboni assimilat durant el marcatge, el qual va representar únicament un 4% del total assimilat (Fig. 5.4.2).

Finalment, el % de carboni exportat a altres òrgans es va estimar per la diferència entre el total i el respirat més l'acumulat. Per ambdues espècies l'exportació va ser el destí majoritari del carboni recentment assimilat per les fulles. Així va ser un 68% a *Chamaerops humilis* (Fig. 5.4.1) i un 94% a *Cycas revoluta* (Fig. 5.4.2).



**Figura 5.4.1.** Model de la gestió foliar del carboni recentment assimilat a *Chamaerops humilis*. Del total de carboni assimilat per les fulles (100%), només un 1% és respirat, el 31% s'acumula i el 68% restant s'exporta cap a altres òrgans, principalment les arrels.



**Figura 5.4.2.** Model de la gestió foliar del carboni recentment assimilat a *Cycas revoluta*. Del total de carboni assimilat per les fulles (100%), només un 2% és respirat, el 4% s'acumula i el 94% restant s'exporta cap a altres òrgans, principalment al tronc i en menor mesura a les arrels.

En conclusió, els resultats obtinguts suggereixen que en ambdues espècies la gestió del carboni assimilat per les fulles està molt relacionada amb la resposta aclimatació a la fotosíntesi al  $\text{CO}_2$  elevat. Així, *Chamaerops humilis*, una espècie que acumula carboni a les fulles de manera important va presentar una aclimatació a la baixa per l'efecte del  $\text{CO}_2$  elevat. En canvi, *Cycas revoluta* exporta a altres òrgans la gran majoria del carboni assimilat, la qual cosa evitaria una acumulació de fotoassimilats que podrien induir una possible aclimatació fotosintètica.



## **6. CONCLUSIONS**

---

## 6. CONCLUSIONS

1. L'anàlisi conjunt de les dades de bescanvi de gasos, fluorescència de les clorofil·les, isòtops estables, microscòpia i de biomassa indica que el metabolisme fotosintètic de *Chamaerops humilis* i *Cycas revoluta* és del tipus C<sub>3</sub>.
2. En ambdues espècies, una exposició a CO<sub>2</sub> elevat de llarga durada (20 mesos) va produir una reducció significativa de la densitat estomàtica, al voltant del 20%.
3. *Chamaerops humilis* va mostrar una marcada aclimatació a la baixa de la fotosíntesi a conseqüència del creixement durant 20 mesos a CO<sub>2</sub> elevat, reflectida en una menor activitat *in vivo* de la Rubisco ( $V_{c,max}$ ), la qual correlaciona amb una disminució del nitrogen foliar.
4. A *Cycas revoluta*, malgrat una disminució de nitrogen a les fulles, no es va observar una reducció de la capacitat fotosintètica per efecte del CO<sub>2</sub> elevat a temperatures inferiors a 30°C. En canvi, la menor activitat fotosintètica observada a temperatures elevades en plantes crescudes a alt CO<sub>2</sub> podria ser causada per una quantitat limitant de Rubisco i/o una disminució de l'estat d'activació a elevades temperatures.
5. No es va observar un efecte directe del CO<sub>2</sub> sobre la taxa de respiració a la foscor ( $R_D$ ) a cap de les dues espècies. A llarg termini, la taxa respiratòria de *Chamaerops humilis* no es va veure pràcticament afectada pel CO<sub>2</sub> elevat, mentre que a *Cycas revoluta* es va reduir significativament.
6. L'efecte a llarg termini del CO<sub>2</sub> elevat sobre la respiració mitocondrial a la llum ( $R_L$ ) coincideix amb la resposta de la respiració a la foscor ( $R_D$ ). Així, a *Chamaerops humilis*, no es va produir efecte del CO<sub>2</sub> sobre la  $R_L$ , mentre que en el cas de *Cycas revoluta*, es va produir una aclimatació a la baixa tant de la taxa de  $R_D$  com de la  $R_L$ .
7. Els punts de compensació (llum, CO<sub>2</sub> i temperatura) van experimentar importants variacions en plantes crescudes a CO<sub>2</sub> elevat, reflectint la resposta aclimatativa de la fotosíntesi i la respiració en ambdues espècies.



8. El CO<sub>2</sub> elevat va estimular de manera molt important la producció de biomassa d'ambdues espècies a través d'un increment en el guany net de carboni per planta. La inferior resposta al CO<sub>2</sub> del creixement de *Chamaerops humilis* (81%) respecte a *Cycas revoluta* (152%) pot estar relacionada amb la menor reducció de la capacitat fotosintètica observada a *Cycas revoluta*.
9. Els resultats mostren que les plantes de creixement lent tenen un bon potencial per aprofitar el CO<sub>2</sub> elevat. Per això, es pot considerar l'adobat carbònic com una tècnica adequada per incrementar la producció d'aquestes espècies en condicions de clima mediterrani, especialment en el cas de *Cycas revoluta*.
10. La cinètica de creixement observada va ser molt diferent entre espècies. *Chamaerops humilis* va mostrar un creixement continu i *Cycas revoluta* un creixement discontinu o a polsos.
11. Les baixes taxes de creixement observades en ambdues espècies són consistents amb les baixes taxes de fotosíntesi i de respiració mesurades.
12. Ambdues espècies presenten una discriminació del carboni durant la respiració al voltant del +6‰.
13. El percentatge de carboni nou present al CO<sub>2</sub> respirat és baix a *Cycas revoluta* (17%) i molt baix a *Chamaerops humilis* (7%). Així, la major part del carboni respirat no prové del recentment assimilat. Per tant, aquest fet sembla indicar que es tracta d'espècies molt conservadores pel que fa al carboni.
14. *Chamaerops humilis* va acumular a les fulles importants quantitats de carboni recentment assimilat, fet que sembla estar relacionat amb l'aclimatació a la baixa de la fotosíntesi observada a elevat CO<sub>2</sub>. En canvi, *Cycas revoluta* exporta a altres òrgans la gran majoria del carboni assimilat, la qual cosa sembla evitar una acumulació de fotoassimilats que desencadenaria una aclimatació fotosintètica.



## **7. BIBLIOGRAFIA**

---



---

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. **Acevedo E, Badilla I, Nobel PS** (1983) Water relations, diurnal activity changes and productivity of a cultivated cactus, *Opuntia ficus-indica*. *Plant Physiol* 72:775-780.
2. **Ainsworth EA, Davey PA, Bernacchi CJ, Dermody OJ, Heaton EA, Moore DJ, Morgan PB, Naidu SL, Ra HY, Zhu X, Curtis PS, Long SP** (2002) A meta-analysis of elevated [CO<sub>2</sub>] effects on soybean (*Glycine max*) physiology, growth and yield. *Global Change Biol* 8:695–709.
3. **Ainsworth EA, Davey PA, Hymus GJ, Osborne CP, Rogers A, Blum H, Nösberger J, Long SP** (2003) Is stimulation of leaf photosynthesis by elevated carbon dioxide concentration maintained in the long term? A test with *Lolium perenne* grown for 10 years at two nitrogen fertilization levels under free air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE). *Plant Cell Environ* 26:705–714.
4. **Allen D, Nogués S, Baker NR** (1998) Ozone depletion and increased UV-B radiation: is there a real threat to photosynthesis? *J Exp Bot* 49: 1775-1788.
5. **Amthor JS** (1989) *Respiration and crop productivity*. New York, Springer Verlag.
6. **Amthor JS** (1997) Plant respiratory responses to elevated CO<sub>2</sub> partial pressure. In: *Advances in carbon dioxide effects research*. American Society of Agronomy Special Publication (proceedings of 1993 ASA Symposium, Cincinnati, OH). Allen LH, Kirkham MB, Olszyk DM, Whitman CE (eds.), pp 35–77. Madison, WI: ASA, CSSA and SSSA.
7. **Amthor JS** (2000) Direct effect of elevated CO<sub>2</sub> on nocturnal in situ leaf respiration in nine temperate deciduous trees species is small. *Tree Physiol* 20: 139–144.
8. **Atkin OK, Millar AH, Gärdestrom P, Day DA** (2000) Photosynthesis, carbohydrate metabolism and respiration in leaves of higher plants. In: *Photosynthesis, Physiology and Metabolism*. Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S (eds.) Kluwer Academic Publishers, Londres.

9. **Atkin OK, Tjoelker MG** (2003) Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. *Trends Plant Sci* 8, 343-351.
10. **Azcón-Bieto J** (1983) Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. *Plant Physiol* 73: 681-686.
11. **Azcón-Bieto J, Osmond CB** (1983) Relationship between photosynthesis and respiration. The effect of carbohydrate status on the rate of CO<sub>2</sub> production by respiration in darkened and illuminated wheat leaves. *Plant Physiol* 71: 574–581.
12. **Azcón-Bieto J, González-Meler MA, Doherty W, Drake BG** (1994) Acclimation of respiratory O<sub>2</sub> uptake in green tissues of field grown native species after long-term exposure to elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. *Plant Physiol* 106: 1163–1168.
13. **Azcón-Bieto J, Fleck I, Aranda X, Xambó A** (2000) Fotosíntesis en un ambiente cambiante. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Azcón-Bieto J, Talón M (eds.) Mc. Graw -Hill/Interamericana, Madrid.
14. **Azcón-Bieto J, Pardo A, Gómez-Casanovas N, Irigoyen JJ, Sánchez-Díaz, M** (2004) Respuesta de la fotosíntesis y la respiración en un medio ambiente variable. En: *La Ecofisiología Vegetal. Una ciencia de síntesis*. Reigosa M, Pedrol N, Sánchez-Moreiras A (eds.) Universidade de Vigo, Vigo.
15. **Badeck FW, Tcherkez G, Nogués S, Piel C, Ghashghaie J** (2005) Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs—a widespread phenomenon. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19: 1381–1391.
16. **Bartak M, Raschi A, Tognetti R** (1999) Photosynthetic characteristics of sun and shade leaves in the canopy of *Arbutus unedo* L. trees exposed to in situ long-term elevated CO<sub>2</sub>. *Photosynthetica Prague* 37 (1): 1-16.
17. **BassiriRad H, Reynolds JF, Virginia RA, Brunelle MH** (1997) Growth and root NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> uptake capacity of three desert species in response to atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment. *Aust J Plant Physiol* 24: 353-358.

18. **Bazzaz FA, Miao SL, Wayne PM** (1993) CO<sub>2</sub> induced growth enhancements of co-occurring tree species decline at different rates. *Oecologia* 96: 478-482.
19. **Beerling DJ** (2005) Leaf Evolution: Gases, Genes and Geochemistry. *Ann Bot* 96: 345-352.
20. **Bernacchi CJ, Singsaas EL, Pimentel C, Portis AR, Long SP** (2001) Improved temperature response functions for models of Rubisco-limited photosynthesis. *Plant Cell Environ* 24: 253–259.
21. **Bernacchi CJ, Pimentel C, Long SP** (2003) *In vivo* temperature response functions of parameters required to model RuBP-limited photosynthesis. *Plant Cell Environ* 26: 1419–1430.
22. **Berry JA, Downton JS** (1982) Environmental regulation of photosynthesis. In: *Photosynthesis: Development, Carbon Metabolism and Productivity*, vol. II, Govindjee (ed.), Academic Press, Nova York.
23. **Biel C, Espelta JM, Meghelli N, de Herralde F, Pardo A, Savé R** (2003) Estudio del efecto del enriquecimiento del aire con dióxido de carbono en el crecimiento de especies leñosas. VII Congreso Nacional de la Asociación Española de Ecología Terrestre, Barcelona.
24. **Bowes G** (1993) Facing the inevitable: Plants and increasing atmospheric CO<sub>2</sub>. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44: 309-332.
25. **Brugnoli E, Hubick KT, von Caemmerer S, Wong SC, Farquhar GD** (1988) Correlation between the carbon isotope discrimination in leaf starch and sugars of C<sub>3</sub> plants and the ratio of intercellular and atmospheric partial pressures of carbon dioxide. *Plant Physiol* 88: 1418-1424.
26. **Brugnoli E, Farquhar GD** (2000) Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. In: *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S (eds.), pp 399-434. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.

27. **Buckley T, Mott K, Farquhar GD** (2003) A hydromechanical and biochemical model of stomatal conductance. *Plant Cell Environ* 26: 1767–1785.
28. **Bunce JA** (2004) A Comparison of the Effects of Carbon Dioxide Concentration and Temperature on Respiration, Translocation and Nitrate Reduction in Darkened Soybean Leaves. *Ann Bot* 93: 665-669.
29. **Calfapietra C, Gielen B, Sabatti M, De Angelis P, Scarascia Mugnozza G, Ceulemans R** (2001) Growth performance of *Populus* exposed to Free Air Carbon dioxide Enrichment during the first growing season in the POPFACE experiment. *An Forest Sci* 58: 819–828.
30. **Callaway RM, DeLucia EH, Thomas EM, Schlesinger WH** (1994) Compensatory responses of CO<sub>2</sub> exchange and biomass allocation and their effects on the relative growth rate of ponderosa pine in different CO<sub>2</sub> and temperature regimes. *Oecologia* 98: 159-166.
31. **Casadesús J** (1995) Estudi dels efectes a curt termini de la demanda hídrica i nutricional de la part aèria sobre els fluxos a través de l'arrel, en el context ecofisiològic del gira-sol. Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona.
32. **Ceulemans R, Mousseau M** (1994) Effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> on woody plants. *New Phytol* 127 (3) 425-446.
33. **Clark LC** (1956) Monitor and control of blood and tissue oxygen tension. *Transactions Am Soc Artif Organs* 2: 41-42.
34. **Cliquet JB, Deléens E, Bousser A, Martin M, Lescure JC, Prioul JL, Mariotti A, Morot-Gaudry JF** (1990a) Estimation of carbon and nitrogen allocation during stalk elongation by <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N tracing in *Zea mays* L. *Plant Physiol* 92: 79–87.
35. **Cliquet JB, Deléens E, Mariotti A** (1990b) C and N mobilization from stalk and leaves during kernel filling by <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N tracing in *Zea mays* L. *Plant Physiol* 94: 1547–1553.
36. **Cen YP, Turpin DH, Layzell DB** (2001) Whole-Plant Gas Exchange and Reductive Biosynthesis in White Lupin. *Plant Physiol* 126: 1555-1565.



37. **Crafts-Brandner SJ, Salvucci ME** (2000) Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13430–13435.
38. **Craig H** (1954) Carbon 13 in plants and relationship between carbon 13 and carbon 14 in nature. *J Geol* 62: 115-149.
39. **Curtis PS, Wang X** (1998) A meta-analysis of elevated CO<sub>2</sub> effects on woody plant mass, form, and physiology. *Oecologia* 113: 299–313.
40. **Dai Z, Ku MSB, Edwards GE** (1993) C<sub>4</sub> Photosynthesis (The CO<sub>2</sub>-Concentrating Mechanism and Photorespiration). *Plant Physiol* 103: 83-90.
41. **Davey PA, Hunt S, Hymus GJ, DeLucia EH, Drake BG, Karnosky DF, Long SP** (2004) Respiratory oxygen uptake is not decreased by an instantaneous elevation of [CO<sub>2</sub>], but is increased with long-term growth in the field at elevated [CO<sub>2</sub>]. *Plant Physiol* 134: 520–527.
42. **Davey PA, Olcer H, Zakhleniuk O, Bernacchi J, Calfapietra C, Long SP, Raines CA** (2006) Can fast-growing plantation trees escape biochemical downregulation of photosynthesis when grown throughout their complete production cycle in the open air under elevated carbon dioxide? *Plant Cell Environ* 29: 1235-1244.
43. **Dawson TE, Brooks PD** (2001) Fundamentals of Stable Isotope Chemistry and Measurement. In: *Stable Isotope Techniques in the Study of Biological Processes and Functioning Ecosystems*. Unkovich M, Pate J, McNeill A, Gibbs DJ (eds.), pp 1-18. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
44. **Dengler NG, Nelson T** (1999) Leaf structure and development in C<sub>4</sub> plants. In: *C<sub>4</sub> Plant Biology*. Sage RF, Monson RK (eds.), pp 133–172. New York: Academic.
45. **De Niro MJ, Epstein S** (1977) Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science* 197, 261–263.

46. **Drake BG, Rogers HH, Allen LH Jr** (1985) Methods of Exposing Plants to Elevated Carbon Dioxide. In: Direct Effects of Increasing Carbon Dioxide on Vegetation. Strain BR, Cure, JD (eds.) United States Department of Energy, Durham.
47. **Drake BG, González-Meler MA, Long SP** (1997) More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO<sub>2</sub>? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 609-639.
48. **Drake BG, Azcón-Bieto J, Berry J, Bunce J, Dijkstra P, Farrar J, Gifford RM, González-Meler MA, Koch G, Lambers H, Siedow J, Wullschleger S** (1999) Does elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration inhibit mitochondrial respiration in green plants? *Plant Cell Environ* 22: 649-657.
49. **Duranceau M, Ghashghaie J, Badeck F, Deléens E, Cornic G** (1999)  $\delta^{13}\text{C}$  of CO<sub>2</sub> respired in the dark in relation to  $\delta^{13}\text{C}$  of leaf carbohydrates in *Phaseolus vulgaris* L. under progressive drought. *Plant Cell Environ* 22: 515-523.
50. **Edwards GE, Franceschi VR, Voznesenskaya EV** (2004) Single-cell C<sub>4</sub> photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm. *Annu Rev Plant Biol* 55: 173-196.
51. **Ehleringer JR, Cerling TE, Helliker BR** (1997) C<sub>4</sub> photosynthesis, atmospheric CO<sub>2</sub>, and climate. *Oecologia* 112: 285-299.
52. **Eichelmann H, Laisk A** (1999) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content, assimilatory charge, and mesophyll conductance in leaves. *Plant Physiol* 119: 179-189.
53. **Ethier GJ, Livingston NJ** (2004) On the need to incorporate sensitivity to CO<sub>2</sub> transfer conductance into the Farquhar-von Caemmerer-Berry leaf photosynthesis model. *Plant Cell Environ* 27:137-153.
54. **Evans JR, Sharkey TD, Berry JA, Farquhar GD** (1986) Carbon isotope discrimination measured concurrently with gas exchange to investigate CO<sub>2</sub> diffusion in leaves of higher plants. *Aust J Plant Physiol* 13: 281–292.

55. **Farage PK, McKee IF, Long SP** (1998) Does a low nitrogen supply necessarily lead to acclimation of photosynthesis to elevated CO<sub>2</sub>? *Plant Physiol* 118:573–80.
56. **Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA** (1980) A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta* 149: 78–90.
57. **Farquhar GD, O’Leary MH, Berry JA** (1982) On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Austr J Plant Physiol* 9: 121-137.
58. **Farquhar GD, Sharkey TD** (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol*. 33: 317-345.
59. **Farquhar GD, Ehleringer RA, Hubick KT** (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 40: 503-537.
60. **Farrar J, Pollock C, Gallagher J** (2000) Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Sci* 154:1–11.
61. **Folch R** (1981) *La vegetació dels països catalans*. Kertres, Barcelona.
62. **Gebbing T, Schnyder H** (2001) <sup>13</sup>C labelling kinetics of sucrose in glumes indicates significant refixation of respiratory CO<sub>2</sub> in the wheat ear. *Aust J Plant Physiol* 28: 1047–1053.
63. **Genty B, Briantais JM, Baker NR** (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochem Biophys Acta*. 990: 87-92.
64. **Ghashghaie J, Badeck FW, 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 Rev* 2: 145-161.
65. **Gibson AC, Nobel PS** (1986) *The Cactus Primer*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

66. **Gifford RM** (2003) Plant respiration in productivity models: conceptualization, representation and issues for global terrestrial carbon-cycle research. *Funct Plant Biol* 30: 171–186.
67. **Gifford RM** (2004) The CO<sub>2</sub> fertilising effect – does it occur in the real world? *New Phytol* 163: 221-225.
68. **González-Meler MA, Ribas-Carbó M, Siedow JN, Drake BG** (1996) Direct inhibition of plant mitochondrial respiration by elevated CO<sub>2</sub>. *Plant Physiol* 112: 1349-1355.
69. **González-Meler MA, Drake BG, Azcón-Bieto J** (1997) Rising atmospheric carbon dioxide and plant respiration. In: *Global Change: Effects of Coniferous Forests and Grasslands*. Breymer I, Hall DO, Melillo JM, Agren GI (eds.) SCOPE, vol. 56, pp. 161-181. John Willey & Sons Ltd., UK.
70. **González-Meler MA, Siedow JN** (1999) Direct inhibition of plant mitochondrial respiration by elevated CO<sub>2</sub>: Does it matter at the tissue or whole-plant level? *Tree Physiol* 19: 253-259.
71. **González-Meler MA, Taneva L, Trueman RJ** (2004) Plant Respiration and Elevated Atmospheric CO<sub>2</sub> Concentration: Cellular Responses and Global Significance. *Ann Bot* 94: 647-656.
72. **González-Meler MA, Taneva L** (2005) Integrated effects of atmospheric CO<sub>2</sub> concentration on plant and ecosystem respiration. In: *Plant respiration: From cell to ecosystem*. Lambers H, Ribas-Carbo M (eds.), pp 225-240. Dordrecht. Springer.
73. **Gray JE, Holroyd GH, van der Lee FM, Bahrami AR, Sijmons PC, Woodwardk FI, Schuch W, Hetherington AM** (2000) The HIC signalling pathway links CO<sub>2</sub> perception to stomatal development. *Nature* 408: 713–716.
74. **Griffin KL, Sims DA, Seemann JR** (1999) Altered night-time CO<sub>2</sub> concentration affects growth, physiology and biochemistry of soybean. *Plant Cell Environ* 22: 91–99.

75. **Gunderson CA, Wullschleger SD** (1994) Photosynthetic acclimation in trees to rising atmospheric CO<sub>2</sub>: a broader perspective. *Photosynth Res* 39 (3): 369-388.
76. **Hamilton JG, Thomas RB, Delucia EH** (2001) Direct and indirect effects of elevated CO<sub>2</sub> on leaf respiration in a forest ecosystem. *Plant Cell Environ* 24: 975-982.
77. **Hanan JJ** (1998) Greenhouses. *Advanced Technology for Protected Horticulture*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
78. **Hansen J** (1990) The Greenhouse Effect. In: McGraw-Hill Yearbook of Science and Technology. Biderman A, Weil J, Richman B (eds.) McGraw-Hill, New York.
79. **Henderson S, von Caemmerer S, Farquhar GD** (1992) Short-term measurements of carbon isotope discrimination in several C<sub>4</sub> species. *Aust J Plant Physiol* 19:263– 85.
80. **Isdo SB, Kimball BA** (1992) Effects of atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment on photosynthesis, respiration and growth of sour orange trees. *Plant Physiol* 99: 341–343.
81. **IPCC** (2001) *Climate Change 2001. The Scientific Basis*. Houghton JT, D Yihui *et al.* (eds.) Cambridge Univ Press, Cambridge.
82. **Jacob J, Greitner C, Drake BG** (1995) Acclimation of photosynthesis in relation to Rubisco and nonstructural carbohydrate contents and in-situ carboxylase activity in *Scirpus olneyi* grown at elevated CO<sub>2</sub> in the field. *Plant Cell Environ* 18: 875–884.
83. **Jahnke S, Krewitt M** (2002) Atmospheric CO<sub>2</sub> concentration may directly affect leaf respiration measurement in tobacco, but not respiration itself. *Plant Cell Environ* 25: 641–651.
84. **Jones HG** (1992) *Plants and microclimate. A quantitative approach to environmental plant physiology*. Cambridge Univ Press, Cambridge.
85. **Keeling CD, Whorf TP** (2002) Atmospheric CO<sub>2</sub> records from sites in the SIO air sampling network. In: *Trends: a compendium of data on global change*. Oak Ridge, TN, USA: Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, US Department of Energy.

86. **Keeling CD, Whorf TP** (2005) Atmospheric CO<sub>2</sub> records from sites in the SIO air sampling network (<http://cdiac.ornl.gov/trends/co2/sio-mlo.htm>).
87. **Kok B** (1948) A critical consideration of the quantum yield of *Chlorella* photosynthesis. *Enzymologia* 13: 1–56.
88. **Körner Ch** (1995) Towards a better basis for upscaling plant responses to elevated CO<sub>2</sub> and climate warming. *Plant Cell Environ* 18: 1101-1110.
89. **Körner Ch** (1999) Alpine plants: stressed or adapted? In: *Physiological Plant Ecology*. Press MC, Scholes JD, Barker MG (eds.), pp 297-312. Blackwell Sciences, Oxford.
90. **Kouchi H, Yoneyama T** (1984) Dynamics of carbon photosynthetically assimilated in nodulated soya bean plants under steady-state conditions. 1. Development and application of <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> assimilation system at a constant <sup>13</sup>C abundance. *Ann Bot (Lond)* 53: 875–882.
91. **Krömer S** (1995) Respiration during photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46: 45-70.
92. **Laetsch WM** (1974) The C<sub>4</sub> Syndrome: A Structural Analysis. *Annu Rev Plant Physiol* 25: 27-52
93. **Laisk AK** (1977) *Kinetics of Photosynthesis and Photorespiration in C<sub>3</sub> Plants*. Nauka, Moscow.
94. **Larcher W** (2003) Carbon utilization and dry matter production. *Physiological Plant Ecology*. pp 69-184. Springer-Verlag, Berlín.
95. **Lawson T, Oxborough K, Morison JIL, Baker NR** (2002) Responses of Photosynthetic Electron Transport in Stomatal Guard Cells and Mesophyll Cells in Intact Leaves to Light, CO<sub>2</sub>, and Humidity. *Plant Physiol* 128: 52-62.
96. **Lewis JD, Olszyk D, Tingey DT** (1999) Seasonal patterns of photosynthetic light response in Douglas-fir seedlings subjected to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and temperature. *Tree Physiol* 19: 243-252.

97. **Lloyd J, Farquhar GD** (1994)  $\delta^{13}\text{C}$  discrimination during  $\text{CO}_2$  assimilation by the terrestrial biosphere. *Oecologia* 99:201–15.
98. **Lloyd J, Farquhar GD** (1996) The  $\text{CO}_2$  dependence of photosynthesis, plant-growth responses to elevated atmospheric  $\text{CO}_2$  concentrations and their interaction with soil nutrient status. 1. General-principles and forest ecosystems. *Funct Ecol* 10: 4–32.
99. **Lloyd J, Farquhar GD** (2000) Do slow-growing species and nutrient-stressed plants consistently respond less to elevated  $\text{CO}_2$ ? A clarification of some issues raised by Poorter (1998). *Glob Change Biol* 6: 871–876.
100. **Long SP** (1991) Modification of the response of photosynthetic productivity to rising temperature by atmospheric  $\text{CO}_2$  concentrations. Has its importance been underestimated? *Plant Cell Environ* 14: 729–39.
101. **Long SP, Ainsworth EA, Rogers A, Ort DR** (2004) Rising Atmospheric Carbon Dioxide: Plants FACE the Future. *Annu Rev Plant Biol* 55: 591-628.
102. **Maillard P, Deléens E, Daudet FA, Lacoïnte A, Frossard JS** (1994) Carbon and nitrogen partitioning in walnut seedlings during the acquisition of autotrophy through simultaneous  $^{13}\text{CO}_2$  and  $^{15}\text{NO}_3$  long-term labelling. *J Exp Bot* 45: 203–210.
103. **Makino A, Harada M, Sato T, Nakano H, Mae T** (1997) Growth and N allocation in rice plants under  $\text{CO}_2$  enrichment. *Plant Physiol* 115:199–203
104. **Martin PN** (1984) Injection of  $\text{CO}_2$  between periods of ventilation can be beneficial. *Connecticut Greenhouse Newsletter* 119: 1-4.
105. **Masvidal LI** (1993) Situació actual de la producció de planta autòctona a Catalunya. Possibilitat d'introducció de noves espècies. A: Apunts de Silvicultura, pp 25-32. DARP, Generalitat de Catalunya.
106. **Matallana A, Montero JI** (1995) Invernaderos. Diseño, construcción y ambientación. Mundi-Prensa, Bilbao.

107. **McCree KJ** (1986) Measuring the whole-plant daily carbon balance. *Photosynthetica* 20:82–93.
108. **McMurtrie RE, Wang YP** (1993) Mathematical models of the photosynthetic response of tree stands to rising CO<sub>2</sub> concentrations and temperature. *Plant Cell Environ* 16: 1-13.
109. **Melillo JM, Janetos AC, Karl TR, Barron EJ, Burkett V, Cecich TF, Corell R, Jacobs K, Joyce L, Miller B, Morgan MG, Parson EA, Richels RG, Schimel DS** (2001) Climate change impacts on the United States: the potential consequences of climate variability and change. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
110. **Mitrakos K** (1980) A theory for Mediterranean plant-life. *Oecol Plant I* (15) 3: 245-252.
111. **Moore BD, Cheng SH, Sims CD, Seemann JR** (1999) The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. *Plant Cell Environ* 22: 567-582.
112. **Morison JIL** (1985) Sensitivity of stomata and water use efficiency to high CO<sub>2</sub>. *Plant Cell Environ* 8: 467–474.
113. **Morison JIL** (1998) Stomatal response to increased CO<sub>2</sub> concentration. *J Exp Bot* 49: 443–452.
114. **Mott KA** (1988) Do stomata respond to CO<sub>2</sub> concentrations other than intercellular. *Plant Physiol* 86: 200–203.
115. **Nakano H, Makino A, Mae T** (1997) The effect of elevated partial pressures of CO<sub>2</sub> on the relationship between photosynthetic capacity and N content in rice leaves. *Plant Physiol* 115: 191–198.
116. **Nie GY, Hendrix DL, Webber AN, Kimball BA, Long SP** (1995) Increased accumulation of carbohydrates and decreased photosynthetic gene transcript levels in wheat grown at an elevated CO<sub>2</sub> concentration in the field. *Plant Physiol* 108: 975–983.



- 
117. **Nogués S, Baker NR** (2000) Effects on drought of photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *J Exp Bot* 51: 1309-1317
118. **Nogués S, Munné-Bosch S, Casadesús J, López-Carbonell M, Alegre L** (2001) Daily time course of whole-shoot gas exchange rates in two droughtexposed Mediterranean shrubs. *Tree Physiol* 21: 51-58.
119. **Nogués S, Tcherkez G, Cornic G, Ghashghaie J** (2004) Respiratory carbon metabolism following illumination in intact French bean leaves using  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope labeling. *Plant Physiol* 136: 3245– 3254.
120. **Nogués S, Damesin C, Tcherkez G, Maunoury F, Cornic G, Ghashghaie J** (2006a)  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope labelling to study leaf carbon respiration and allocation in twigs of field-grown beech trees. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20: 219–226.
121. **Nogués S, Tcherkez G, Streb P, Pardo A, Baptist F, Bligny R, Ghashghaie J, Cornic G** (2006b) Respiratory carbon metabolism in the high mountain plant species *Ranunculus glacialis*. *J Exp Bot* (en premsa).
122. **Norby RJ, Wullschleger SD, Gunderson CA, Johnson DW, Ceulemans R** (1999) Tree responses to rising  $\text{CO}_2$  in field experiments: implications for the future forest. *Plant Cell Environ* 22: 683–714.
123. **Norstog KJ, Nicholls TJ** (1997) *The Biology of the Cycads*. Cornell Univ Pr, New York.
124. **Nowak RS, Ellsworth DS, Smith SD** (2004) Functional responses to elevated atmospheric  $\text{CO}_2$  – do photosynthetic and productivity data from FACE experiments support early predictions? *New Phytol* 162: 253-280.
125. **Pearcy RW, Björkman O** (1983) Physical effects. In:  *$\text{CO}_2$  and plants. The Response of Plants to Rising Levels of Atmospheric Carbon Dioxide*. Lemon ER (ed.), pp. 65-105. American Society for the Advancement of Science, Washington DC, USA.
126. **Peisker M, Apel H** (2001) Inhibition by light of  $\text{CO}_2$  evolution from dark evolution: comparison of two gas exchange methods. *Photosynth Res* 70: 291–298.

127. **Peñuelas J, Matamala R** (1990) Changes in N and S leaf content, stomatal density and specific leaf area of 14 plant species during the last three centuries of CO<sub>2</sub> increase. *J Exp Bot* 41: 1119-1124.
128. **Pinelli P, Loreto F** (2003) <sup>12</sup>C<sub>2</sub> emission from different metabolic pathways measured in illuminated and darkened C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> leaves at low, atmospheric and elevated CO<sub>2</sub> concentration. *J Exp Bot* 54: 1761–1769.
129. **Pons TL, Welschen RAM** (2002) Overestimation of respiration rates in commercially available clamp-on leaf chambers. Complications with measurement of net photosynthesis. *Plant Cell Environ* 25: 1367.
130. **Poorter H, Villar R** (1997) Chemical composition of plants: causes and consequences of variation in allocation of C to different plant constituents. In: *Plant resource allocation*. Bazzaz F, Grace J (eds.), pp 39–72. Academic Press, New York.
131. **Poorter H, VanBerkel Y, Baxter R, DenHertog J, Dijkstra P, Gifford RM, Griffin KL, Roumet C, Roy J, Wong SC** (1997) The effect of elevated CO<sub>2</sub> on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C<sub>3</sub> species. *Plant Cell Environ* 20: 472–482.
132. **Poorter H** (1998) Do slow-growing species and nutrient-stressed plants respond relatively strongly to elevated CO<sub>2</sub>? *Glob Change Biol* 4: 693–697.
133. **Poorter H, Pérez-Soba M** (2001) The growth response of plants to elevated CO<sub>2</sub> under non-optimal environmental conditions. *Oecologia* 129: 1-20.
134. **Poorter H, Pérez-Soba M** (2002) Plant Growth at Elevated CO<sub>2</sub>. In: *Volume 2, The Earth system: biological and ecological dimensions of global environmental change*, pp 489–496. Mooney HA, Canadell JG (eds.). *Encyclopedia of Global Environmental Change*. Munn T (ed. Chief). Chichester.
135. **Poorter H, Navas ML** (2003) Plant growth and competition at elevated CO<sub>2</sub>: On winners, losers and functional groups. *New Phytol* 157: 175-198.

- 
136. **Portis RP Jr** (2003) Rubisco activase – Rubisco’s catalytic chaperone. *Photosynthesis Res* 75: 11-27.
137. **Prentice I, Farquhar GD, Fasham M, Goulden M, Heinmann M, Jaramillo VJ, Kheshgi HS, Le Quéré C, Scholes RJ, Wallace DWR** (2001) The carbon cycle and atmospheric carbon dioxide. In: *Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contributions of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. JT Houghton, Y Ding, DJ Griggs, M Noguer, PJ van der Linden, et al. (eds.), pp 183–238. Cambridge, UK. Cambridge Univ. Press.
138. **Rabinowitch EI** (1956) *Photosynthesis, Vol 2*. Interscience Publishers, New York.
139. **Reich PB, Tjoelker MG, Machado JL, Oleksyn J** (2006) Universal scaling of respiratory metabolism, size and nitrogen in plants. *Nature* 439: 457-461.
140. **Ribas-Carbó M, Berry JA, Yakir D, Giles L, Robinson SA, Lennon AM, Siedow JN** (1995) Electron partitioning between the cytochrome and alternative pathways in plant mitochondria. *Plant Physiol* 109: 829–837.
141. **Rogers A, Ellsworth DS, Humphries SW** (2001) Possible explanation of the disparity between the *in vitro* and *in vivo* measurements of Rubisco activity: a study in loblolly pine grown in elevated pCO<sub>2</sub>. *J Exp Bot* 52: 1555–1561.
142. **Rolland F, Moore B, Sheen J** (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14: S185–205.
143. **Sage RF (2002)** C<sub>4</sub> photosynthesis in terrestrial plants does not require Kranz anatomy. *Trends Plant Sci* 7 (7) 283-285.
144. **Sánchez-Díaz M, Irigoyen JJ, Gómez-Casanovas N, Pardo A, Azcón-Bieto J (2004)** El Cambio Climático Global. Efecto Previsible del CO<sub>2</sub> sobre los vegetales. En: *La Ecofisiología Vegetal. Una ciencia de síntesis*. Reigosa M, Pedrol N, Sánchez-Moreiras A (eds.). Universidade de Vigo, Vigo.

145. **Sánchez-Guerrero Cantó MC** (1999) Enriquecimiento carbónico en cultivos hortícolas bajo invernadero de polietileno. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia.
146. **Savé R, de Herralde F, Cabot P, Biel C** (1996) Revegetación, una propuesta entre la jardinería y la restauración. *Arquitectura del paisaje*. 22: 18-19.
147. **Savé R, DeHerralde F, Retana J, Espelta JM, Biel C** (1998) Effect of elevated CO<sub>2</sub> on plant productivity and hardening under Mediterranean conditions. *Proc. The Earth's Changing Land. GCTE-LUCC Open Science Conference on Global Change*. 68.
148. **Saxe H, Ellsworth DS, Heath J** (1998) Tree and forest functioning in a enrichment CO<sub>2</sub> atmosphere. *New Phytol* 139: 395-436.
149. **Schnyder H, Schäufele R, Lötscher M, Gebbing T** (2003) Disentangling CO<sub>2</sub> fluxes: direct measurements of mesocosm-scale natural abundance <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>/<sup>12</sup>CO<sub>2</sub> gas exchange, <sup>13</sup>C discrimination, and labelling of CO<sub>2</sub> exchange flux components in controlled environments. *Plant Cell Environ* 26: 1863–1874.
150. **Schreiber U, Bilger W, Neubauer C** (1994) Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. In: *Ecophysiology of Photosynthesis. Ecological Studies*. Schulze ED, Caldwell MM (eds). Springer-Verlag, Berlín.
151. **Schulze ED, Mooney HA** (1993). *Design and Execution of Experiments on CO<sub>2</sub> Enrichment*. Comission of the European Communities, Brussels.
152. **Serna L, Fenoll C** (2000) Coping with human CO<sub>2</sub> emissions. *Nature* 408: 656-657.
153. **Shapiro JB, Griffin KL, Lewis JD, Tissue DT** (2004) Response of *Xanthium strumarium* leaf respiration in the light to elevated CO<sub>2</sub> concentration, nitrogen availability and temperature. *New Phytol* 162: 377–386.
154. **Sharkey TD** (1989) Evaluating the role of Rubisco regulation in photosynthesis of C<sub>3</sub> plants. *Phil Trans R Soc London* 323: 434–448.

- 
155. **Smart DR, Chatterton NJ, Bugbee B** (1994) The influence of elevated CO<sub>2</sub> on non-structural carbohydrate distribution and fructan accumulation in wheat canopies. *Plant Cell Environ* 17:435–442.
156. **Smeekens S** (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 51:49–81
157. **Stevenson DW** (1980) Radial Growth in the Cycadales. *Am J Botany* 67 (4): 465-475.
158. **Stitt M, Krapp A** (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell Environ* 22: 583-621.
159. **Tambussi EA, Nogués S, Araus JL** (2005) Ear of durum wheat under water stress: water relations and photosynthetic metabolism. *Planta* 221: 446-458.
160. **Tcherkez G, Nogués S, Bleton J, Cornic G, Badeck F, Ghashghaie J** (2003) Metabolic origin of carbon isotope composition of leaf dark-respired CO<sub>2</sub> in French bean. *Plant Physiol* 131: 237–244.
161. **Tcherkez G, Cornic G, Bligny R, Gout E, Ghashghaie J** (2005) *In Vivo* Respiratory Metabolism of Illuminated Leaves. *Plant Physiol* 138: 1596-1606.
162. **Teare ID, Peterson GJ, Law AG** (1971) Size and frequency of leaf stomata in cultivars of *Triticum aestivum* and other *Triticum* species. *Crop Sci* 11:496-498.
163. **Terradas J** (2001) Ecología de la vegetación: de la ecología de las plantas a la dinámica de comunidades y paisajes. Ed. Omega, Barcelona.
164. **Tjoelker MG, Reich PB, Oleksyn J** (1999) Changes in leaf nitrogen and carbohydrates underlie temperature and CO<sub>2</sub> acclimation of dark respiration in five boreal species. *Plant Cell Environ* 22: 767–778.
165. **Tognetti R, Cherubini P, Innes JL** (2000) Comparative stem-growth rates of Mediterranean trees under background and naturally enhanced ambient CO<sub>2</sub> concentrations. *New Phytol* 146(1): 59-74.

166. **Tolbert NE** (1997) The C<sub>2</sub> Oxidative Photosynthetic Carbon Cycle. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 1-25.
167. **Tremblay N, Gosselin A** (1998) Effect of carbon dioxide enrichment and light. *HortTechnology* 8 (4): 524-528.
168. **van Iersel MW** (2003) Carbon use efficiency depends on growth respiration, maintenance respiration, and relative growth rate. A case study with lettuce. *Plant Cell Environ* 26: 1441-1449.
169. **Villar R, Held AA, Merino J** (1994) Comparison of methods to estimate dark respiration in the light in leaves of two woody species. *Plant Physiol* 105: 167-172.
170. **von Caemmerer S, Farquhar GD** (1981) Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153: 376-387.
171. **Voznezenskaya E, Franceschi VR, Kiirats O, Freitag H, Edwards GE** (2001) Kranz anatomy is not essential for terrestrial C<sub>4</sub> photosynthesis. *Nature* 414: 543-546.
172. **Walters RG** (2005) Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *J Exp Bot* 56: 435-447.
173. **Wang X, Lewis JD, Tissue DT, Seemann JR, Griffin KL** (2001) Effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration on leaf dark respiration of *Xanthium strumarium* in light and in darkness. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2479–2484.
174. **Watson RT, Zinyowera MC, Moss RH** (1998) The regional impacts of climate change: an assessment of vulnerability. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
175. **WHO, World Health Organisation** (1984) Evaluation of Exposures to Airborne Particles in the Work Environment. Offset Pub. 80.
176. **Will RE, Teskey RO** (1997) Effect of elevated carbon dioxide concentration and root restriction on net photosynthesis, water relations and foliar carbohydrate status of loblolly pine seedlings. *Tree Physiol* 17: 655-661.

177. **Wolfe DW, Gifford RM, Hilbert D, Luos Y** (1998) Integration of photosynthetic acclimation to CO<sub>2</sub> at the whole-plant level. *Global Change Biology* 4: 879-893.
178. **Woodward FI** (1987) Stomatal numbers are sensitive to increases in CO<sub>2</sub> from preindustrial levels. *Nature* 327: 617-618.
179. **Wullschleger SD, Norby RJ, Hanson PJ** (1995) Growth and maintenance respiration in stems of *Quercus alba* after four years of CO<sub>2</sub> enrichment. *Physiol Plantarum* 93: 47–54.
180. **Xu CY, Lin GH, Griffin KL, Sambrotto RN** (2004) Leaf respiratory CO<sub>2</sub> is <sup>13</sup>C-enriched relative to leaf organic components in five species of C<sub>3</sub> plants. *New Phytol* 163: 499-505.
181. **Zhao D, Reddy R, Kakani VG, Mohammed AR, Read JJ, Wei G** (2004) Leaf and Canopy Photosynthetic Characteristics of Cotton (*Gossypium Hirsutum* L.) under Elevated CO<sub>2</sub> Concentration and UV-B Radiation. *J Plant Physiol* 161:581-590.
182. **Zerihun A, Gutschick VP, BassiriRad H** (2000) Compensatory rules of nitrogen uptake and photosynthetic N-use efficiency in determining plant growth response to elevated CO<sub>2</sub>: evaluation using a functional balance model. *Ann Bot* 86: 723-730.