



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

EFFECTO DE LA ELEVACIÓN DE CO₂ Y TEMPERATURA EN LA FISIOLÓGÍA Y VALOR REPRODUCTIVO DE LÍNEAS DIPLOIDES Y POLIPLOIDES DEL COMPLEJO *BRACHYPODIUM* *DISTACHYON* (POACEAE): UNA APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL DE SIMULACIÓN DE CAMBIO CLIMÁTICO

Alumna: Rodríguez Ortiz, Ana Isabel

Tutor/a: Prof. D. Antonio José Manzaneda Ávila

Dpto: Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología

Noviembre, 2021



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

**Máster Universitario en Análisis, Conservación y Restauración de
Componentes Físicos y Bióticos de los Hábitats.**

Trabajo Fin de Máster

**EFFECTO DE LA ELEVACIÓN DE CO₂ Y
TEMPERATURA EN LA FISIOLÓGÍA Y
VALOR REPRODUCTIVO DE LÍNEAS
DIPLOIDES Y POLIPLOIDES DEL
COMPLEJO *BRACHYPODIUM*
DISTACHYON (POACEAE): UNA
APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL DE
SIMULACIÓN DE CAMBIO CLIMÁTICO**

Autora:

Ana Isabel Rodríguez Ortiz

Director:

Antonio José Manzaneda Ávila

Jaén, Noviembre de 2021

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT.....	4
1. Introducción.....	6
1.1. Clasificación taxonómica y distribución del género <i>Brachypodium</i>	7
1.2. <i>Brachypodium distachyon</i> como especie modelo de gramíneas templadas	7
1.3. Especies anuales de <i>Brachypodium</i>	8
1.3.1. Ecología y ecofisiología del complejo <i>B. distachyon</i>	9
1.4. Comportamiento de las especies al cambio climático	10
1.4.1. Aumento de la temperatura	10
1.4.2. Estrés abiótico y aridez	11
1.4.3. Aumento de las concentraciones de CO ₂	13
2. Objetivos	14
3. Materiales y métodos	15
3.1. Proceso experimental	15
3.2. Medidas de intercambio gaseoso	20
3.3. Medición de rasgos funcionales	23
3.4. Floración	25
3.5. Análisis estadístico	26
4. Resultados	28
4.1. Rasgos de intercambio gaseoso y rasgos funcionales	28
4.2. Tiempo de floración	36
5. Discusión	43
5.1. Efectos del aumento térmico y/o niveles de CO ₂ en el intercambio gaseoso	43

5.2. Influencia del incremento de las temperaturas y/o del CO ₂ en los rasgos funcionales	47
5.3. Efectos de la elevación térmica y/o incremento del CO ₂ en el periodo de floración	49
5.4. Respuestas de las especies diploides y poliploides a la elevación del CO ₂ y/o de la temperatura. Efecto de la poliploidía	53
6. Conclusiones	54
7. Referencias	55
8. Anexo I	61

RESUMEN

El cambio climático se relaciona con un aumento de las concentraciones de CO₂ y de las temperaturas a nivel global pero sus efectos no repercutirán de igual manera en todas las zonas y especies. Mientras que el aumento de los niveles de CO₂ será uniforme a escala global, el incremento térmico no será homogéneo en todo el planeta y habrá regiones y ecosistemas que se calentarán relativamente más que otras. Así pues, es de especial interés conocer cómo afectarán los componentes de cada variable de cambio climático tanto de forma conjunta como por separado.

Esta investigación se ha basado en conocer el comportamiento del complejo de especies o microespecies de gramíneas *Brachypodium distachyon* (*Brachypodium distachyon*, *Brachypodium hybridum* y *Brachypodium stacei*) bajo condiciones de temperatura elevada y CO₂ actual vs. CO₂ elevado y temperatura actual, tanto en presencia de agua como en estrés hídrico, así como, saber la influencia genética. Para ello, se han estudiado variables del intercambio gaseoso – fotosíntesis y conductividad estomática – y la eficiencia intrínseca en el uso del agua de estas tres especies, así como sus rasgos funcionales (área foliar específica y contenido relativo de agua) y su periodo de floración. Sus respuestas ecofisiológicas, aunque fueron variables, indicaron que se vieron influenciadas principalmente por la disponibilidad de agua, seguido del clima. Además, se ha comprobado que, de manera aislada, el aumento de la temperatura y el CO₂ tiene un fuerte efecto sobre algunos de estos rasgos, especialmente en la floración y producción de semillas, pudiendo comprometer la futura supervivencia de alguna de las especies estudiadas.

Palabras clave: Cambio climático, temperatura elevada, CO₂ elevado, *Brachypodium*, floración.

ABSTRACT

Climate change is related to an increase in CO₂ concentrations and global temperatures, but its effects won't affect all areas and species in the same way. While the increase in CO₂ levels will be uniform on a global scale, the thermal increase won't be homogeneous throughout the planet and there will be regions and ecosystems that will warm up relatively more than others. Thus, it is of special interest to know how the components of each climate change variable will affect both jointly and separately.

This research has been based on knowing the behavior of the complex of species or microspecies of grasses *Brachypodium distachyon* (*Brachypodium distachyon*, *Brachypodium hybridum* and *Brachypodium stacei*) under conditions of high temperature and current CO₂ vs. high CO₂ and current temperature, both in the presence of water and in water stress, as well as, knowing the genetic influence. To this effect, variables of gas exchange - photosynthesis and stomatal conductivity - and the intrinsic efficiency in the use of water of these three species, as well as their functional traits (specific leaf area and relative water content) and their flowering period have been studied. Their ecophysiological responses, although variable, indicated that they were mainly influenced by water availability, followed by climate. In addition, it has been proven that, in isolation, the increase in temperature and CO₂ has a strong effect on some of these traits, especially in flowering and seed production, and may compromise the future survival of some of the species studied.

Keywords: Climate change, high temperature, high CO₂, *Brachypodium*, flowering.

1. Introducción

Muchas de las especies que conforman el grupo de las gramíneas son la principal base alimentaria del ser humano y del ganado doméstico, mostrando con ello la gran relevancia y dependencia que el hombre tiene de ellas (Kellogg, 2001; Vogel, 2016). Pero el auge de los efectos del cambio climático, como las sequías o el incremento de las temperaturas, están afectando directamente sobre la productividad de los cultivos agrícolas, comprometiendo su rendimiento, abastecimiento futuro e, incluso, su expresión génica (Bertolini *et al.*, 2013; Wheeler y von Braun 2013; Gordon *et al.*, 2014; Des Marais y Juenger, 2016). A pesar de que también se espera que la producción de los cultivos se incremente un 1,8% cada década a nivel mundial conforme lo hagan los rangos de CO₂, el también aumento de las temperaturas amortiguará este hecho, provocando un descenso de la producción de un 1,5% cada década (Lobell y Gourdji, 2012; Harsant *et al.*, 2013). De este modo, conforme sus efectos aumenten en intensidad y periodicidad (especialmente los valores térmicos), disminuirá la productividad de los cultivos, algo que se verá reflejado en una menor cantidad de espiguillas y espigas o en que se producirán efectos negativos tanto en la producción de semillas como en sus diseminaciones como consecuencia de un menor crecimiento de las plantas provocado por el aumento térmico (Harsant *et al.*, 2013; Crous, 2019; IPCC, 2019).

De igual forma, se prevé que tanto el desarrollo como el crecimiento de las especies vegetales sufran efectos relevantes como consecuencia de las sequías que cada vez serán más reiteradas y severas, lo cual implica que se necesiten producir cultivos que resistan al déficit hídrico (Luo *et al.*, 2011; Gordon *et al.*, 2014). Esto fomenta la búsqueda activa de métodos para renovar las técnicas de agricultura y aumentar la producción de recursos, así como, conocer cómo las especies vegetales pueden adaptarse ante situaciones cada vez más extremas de temperatura elevada y sequía (Wheeler y von Braun 2013; Des Marais y Juenger, 2016).

El género *Brachypodium* surge como una herramienta para poder estudiar estos asuntos gracias a su gran diversidad natural como genética y su condición de planta modelo (Des Marais y Juenger, 2016). De entre sus especies, *Brachypodium distachyon* es un sistema modelo de gramíneas, cereales y de pastos de forraje de regiones templadas, cuya importancia reside en que permite conocer la ecología de las gramíneas anuales, así como, sus características genéticas, fisiológicas y filogenéticas (Schwartz *et al.*, 2010; Scholthof *et al.*, 2018). Asimismo, se puede emplear dicha variedad genética como medio para investigar los agentes de estrés abiótico de los cultivos de cereales primordiales y las características adaptativas que pueden desarrollar en dichas circunstancias (Scholthof *et al.*, 2018).

1.1. Clasificación taxonómica y distribución del género *Brachypodium*

La familia Poaceae es una de las familias vegetales más extendidas y abundantes en el mundo (Wilson *et al.*, 2016). En ella se encuentra la subfamilia Pooideae que comprende una gran diversidad de cereales y plantas forrajeras, como el trigo o la cebada, y cuya amplia presencia se centra principalmente en regiones templadas (Ozdemir *et al.*, 2008; Des Marais y Juenger, 2016; Wilson *et al.*, 2016). A su vez, dentro la subfamilia Pooideae, se encuentra la tribu Brachypodieae, donde *Brachypodium* es el único género que la compone (Catalán y Olmstead, 2000; Catalán *et al.*, 2016).

Brachypodium es un género constituido por 20 especies de gramíneas monocotiledóneas (3 anuales y 17 perennes) de sistema fotosintético tipo C3 que, aunque habitan en ambientes templados, ha logrado establecerse en todo el planeta, a excepción de la Antártida (**Figura 1**) (Des Marais y Juenger, 2016; Wilson *et al.*, 2016; Catalán *et al.*, 2016; Sancho *et al.*, 2018; Scholthof *et al.*, 2018). De entre ellas, *Brachypodium hybridum*, una de las especies anuales del género, ha llegado a naturalizarse en diversas zonas fuera de su rango nativo, como por ejemplo California, mientras que, de entre sus especies perennes, *Brachypodium sylvaticum* ha invadido también otros territorios como la zona occidental de Australia (Catalán *et al.*, 2016; Sancho *et al.*, 2018; Scholthof *et al.*, 2018). La presencia de las especies de *Brachypodium* en esta pluralidad de ecosistemas puede ser indicativo de que presenta una variada plasticidad fenotípica o capacidad adaptativa, que le permite perdurar en diferentes ambientes (Des Marais y Juenger, 2016).

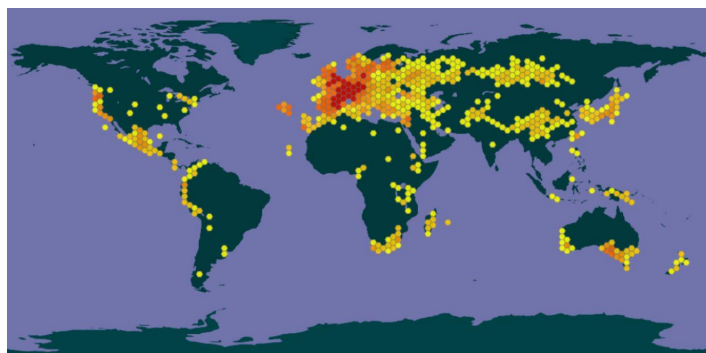


Figura 1: Distribución actual del género *Brachypodium* en el mundo. Fuente: [GBIF](#)

1.2. *Brachypodium distachyon* como especie modelo de gramíneas templadas

La especie *B. distachyon* es una gramínea de tamaño pequeño que se halla ampliamente distribuida por todo el Mediterráneo, el cual es su lugar de origen, alcanzando Medio Oriente, la zona meridional de Europa y África septentrional (Catalán *et al.*, 2012; Des

Marais y Juenger, 2016). Considerada como la especie más distintiva del género, está presente en una gran diversidad de ecosistemas, desde el nivel del mar hasta cotas próximas a los 2000 m (Catalán *et al.*, 2012; Des Marais y Juenger, 2016; Scholthof *et al.*, 2018). Asimismo, la actividad humana y la globalización ha facilitado su introducción y expansión a otras zonas templadas del planeta como el sur de Australia, Nueva Zelanda, América del Norte, Latinoamérica, Europa Central o Sudáfrica (**Figura 2**) (Bakker *et al.*, 2009; Catalán *et al.*, 2012; Des Marais y Juenger, 2016).



Figura 2: Distribución actual de *Brachypodium distachyon* a escala global. Fuente: [GBIF](#)

Muchas de sus características genéticas como morfológicas le han permitido convertirse en un especie modelo de gramíneas con el que poder investigar mejoras en la productividad de los cultivos forrajeros y de cereales (Garvin *et al.*, 2008; Ozdemir *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2011). Las más destacadas son su corto ciclo vital, su genoma pequeño y compacto, su capacidad de autofecundación, su alto índice de germinación tanto a nivel natural como experimental, su fácil cruzamiento y la existencia de ecotipos con diploidía (Draper *et al.*, 2001; Garvin *et al.*, 2008; Ozdemir *et al.*, 2008; Schwartz *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2011; Catalán *et al.*, 2012; Catalán *et al.*, 2014; Scholthof *et al.*, 2018). Además, en el árbol filogenético de las Poaceae, *Brachypodium* posee un parentesco mayor con los cultivos de gran rentabilidad económica, como son los pertenecientes a los géneros *Avena*, *Triticum*, *Hordeum* y *Secale* (destacándose, respectivamente, a la avena, el trigo, la cebada y el centeno), que en comparación con otras especies modelo utilizadas (Kellogg, 2001; Garvin *et al.*, 2008; Ozdemir *et al.*, 2008; Watt *et al.*, 2009; Catalán *et al.*, 2012; Scholthof *et al.*, 2018).

1.3. Especies anuales de *Brachypodium*

Aunque en un inicio se pensaba que el género tenía solamente como especie anual a *B. distachyon*, al estudiar su cariotipo, descubrieron en ella tres citotipos que revelaban distintas ploidías ($2n = 10$, $2n = 20$ y $2n = 30$). La diferencia en el número de juegos

cromosómicos se argumentó en un principio como que, estos citotipos, en realidad eran individuos que, dentro *B. distachyon*, poseían diploidía, tetraploidía y hexaploidía y que procedían de una antigua serie autoploiploide cuyos cromosomas base eran $x=5$ (Catalán *et al.*, 2012; Scholthof *et al.*, 2018). Pero nuevas investigaciones de base fenotípica, filogenética y citogenética han demostrado de manera irrefutable de que se trataban de tres especies anuales relacionadas filogenéticamente, pero completamente distintas pertenecientes al género *Brachypodium* (Catalán *et al.*, 2012; López-Álvarez *et al.*, 2012; Scholthof *et al.*, 2018). Por un lado, se encuentran *Brachypodium distachyon* ($2n=2x=10$) y *Brachypodium stacei* ($2n=2x=20$), ambas diploides pero con diferentes cromosomas base, ($x=5$) y ($x=10$) respectivamente, y, por otro lado, está *Brachypodium hybridum* ($2n=4x=30$) que es un alelotetraploide que tuvo su origen después del cruzamiento de ambas especies anuales diploides hace un millón de años, provocando que se duplicase su genoma ($x=10+5$) (Catalán *et al.*, 2012; López-Álvarez *et al.*, 2015; Sancho *et al.*, 2018; Scholthof *et al.*, 2018).

En términos filogenéticos, se puede incluso señalar que la primera especie en divergir de dicho antepasado común fue *B. stacei*, convirtiéndose en la especie diploide más antigua de *Brachypodium*, después le prosiguió *B. distachyon* y, por último, surgió el híbrido *B. hybridum* (Scholthof *et al.*, 2018). Su genoma, al ser la sumatoria de los de sus padres, es mucho mayor que los de ellos, mientras que el de *B. stacei* y *B. distachyon* son pequeños, casi semejantes, siendo el genoma de *B. stacei* el de menor tamaño aun estando dotado de un número cromosómico mayor que *B. distachyon* (Scholthof *et al.*, 2018; Penner *et al.*, 2020; Shiposha *et al.*, 2020). De igual forma, debe destacarse que, hace poco, se ha manifestado el interés de utilizar a estas tres especies anuales como modelo de microespeciación por poliploidía de las poáceas (Catalán *et al.*, 2014).

1.3.1. *Ecología y ecofisiología del complejo B. distachyon*

En su área de distribución natural, el complejo *B. distachyon* se encuentra separado tanto a nivel territorial como ecológico (Manzaneda *et al.*, 2012, Rey *et al.*, 2017). Cada una de ellas ha llegado a establecerse en diferentes nichos ecológicos, aludiéndose esto a términos evolutivos y/o adaptativos (López-Álvarez *et al.*, 2015). Las mayores diferencias en su rango ocupacional natural se encuentran en *B. distachyon*, el cual se halla en zonas altitudinales, donde existe humedad alta y bajas temperaturas, y en *B. stacei*, cuya especie se encuentra adaptada a la aridez y a la falta de agua, por lo que tiene preferencia por los territorios cálidos y con baja humedad. Por el contrario, *B. hybridum* se establece en latitudes intermedias y de forma superpuesta a sus progenitores, especialmente, junto a

poblaciones de *B. stacei* (Des Marais y Juenger, 2016; López-Álvarez *et al.*, 2015; Scholthof *et al.*, 2018).

Ahora bien, para que las especies heteroploides puedan subsistir en hábitats en los que se encuentran sus progenitores, han de expresar una mayor competitividad frente a ellos mientras que, para poder establecerse en otros territorios que difieren del original y en los que sus parientes diploides no pueden ocupar de manera exitosa, deben ser tolerantes competitivamente (Rey *et al.*, 2017). Como se ha comentado anteriormente, *B. hybridum* se distingue por ser la única de las tres anuales que ha llegado a naturalizarse en otros territorios que difieren de los originales, indicando con ello que posee un mayor nivel de adaptabilidad que sus progenitores, siendo esto determinado por su heteroploidía (Scholthof *et al.*, 2018). Igualmente, posee un aislamiento reproductivo con respecto a *B. distachyon* y *B. stacei*, lo que suele fomentar en los alotetraploides una mayor especiación (Scholthof *et al.*, 2018; Shiposha *et al.*, 2020).

Respecto a la floración, cabe destacar que existe una relación entre los factores de luz y temperatura y el periodo de floración de cada uno de los genotipos de *Brachypodium*, de tal forma que, cambios generalizados en estos parámetros afectarán al momento en que aparecerá la primera inflorescencia (Schwartz *et al.*, 2010). Asimismo, existen diferencias entre las tres especies anuales descritas pues, mientras que *B. stacei* y *B. hybridum* no requieren de vernalización (requerimiento de frío para iniciar la floración) para que tenga lugar su periodo reproductivo, *B. distachyon*, necesita de ella para una gran variedad de genotipos que lo componen (Scholthof *et al.*, 2018). Por otra parte, a pesar de tienen igual morfología, *B. distachyon* tienen un crecimiento mucho menos acelerado, menor biomasa y genera menor cantidad de semillas que *B. hybridum* y *B. stacei* (Wilson *et al.*, 2016).

1.4. Comportamiento de las especies al cambio climático

1.4.1. Aumento de la temperatura

El incremento de la temperatura como consecuencia del cambio climático puede repercutir en la productividad de las plantas de varias formas. La primera de ellas, consiste en la aparición de un ciclo de vida más acelerado, lo cual implica, en muchos casos, una menor producción. La segunda, es que la elevación de las temperaturas influirá negativamente en las tasas de intercambio gaseoso de las plantas C3 y C4, así como, en la cantidad de sustancias de reserva almacenadas en las semillas (Lobell y Gourdj, 2012). A pesar de ello, las especies vegetales tienen una respuesta diferente atendiendo al tipo de

clima en el que se encuentren, pues su capacidad adaptativa les permite adecuarse a las temperaturas elevadas mediante un incremento del área foliar o de la temperatura óptima fotosintética o también disminuyendo la tasa respiratoria, siempre y cuando haya presencia hídrica suficiente (Kirschbaum, 2004; Crous, 2019). Una tercera vía, es el crecimiento continuo del déficit de presión de vapor debido al incremento térmico que provoca una disminución de la eficiencia del uso de agua. La cuarta es que las células vegetales pueden verse perjudicadas pues, por ejemplo, las altas temperaturas pueden generar estrés durante la reproducción de las plantas, pudiendo estimular la esterilidad o una reducción de la producción. Por último, los efectos conjuntos del aumento de la temperatura y de las concentraciones de CO₂ podría fomentar el incremento de enfermedades y plagas que comprometerá la seguridad alimentaria global (Lobell y Gourdji, 2012; Catalán *et al.*, 2014). Además, otra de las consecuencias que el cambio climático está potenciando a nivel global es la aridez (Berdugo *et al.*, 2020). Es en estas regiones donde se espera que la producción agrícola y ganadera disminuya como consecuencia de la desertificación y el cambio climático (IPCC, 2019).

1.4.2. Estrés abiótico y aridez

Cuando las especies vegetales se ven sometidas a factores estresantes, se produce una modificación de su etapa de desarrollo y crecimiento que se basa en una redistribución de sus recursos y una disminución de su índice de crecimiento, siendo diversas redes de genes las que regulan este tipo reacciones ante la sequía (Bertolini *et al.*, 2013). Asimismo, para enfrentarse a periodos reducidos de altas temperaturas, las plantas no sólo tienden a elaborar moléculas de carácter protector (e.g., prolina), sino que también buscan enfriarse incrementando su transpiración, algo que puede verse afectado negativamente si, junto a las altas temperaturas, existe estrés hídrico (Des Marais y Juenger, 2016).

Con base en esto, se distinguen tres estrategias mediante las cuales las especies vegetales tienden a atenuar el estrés abiótico (Manzaneda *et al.*, 2015; Des Marais y Juenger, 2016; Penner *et al.*, 2020):

- Tolerancia a la sequía: tiene lugar cuando es ineludible la pérdida de agua celular. Ante esto, las plantas sintetizan proteínas que garanticen que las células no sufrirán graves daños y que puedan restablecerse tras la carencia de agua (Des Marais y Juenger, 2016). Los individuos subsisten aun estando regidos por escasez de agua (Penner *et al.*, 2020).

- Evitación de la sequía: manifestación de una serie de comportamientos fisiológicos mediante los cuales buscan eludir que sus células se deshidraten, para ello, pueden desarrollar un uso más eficiente del agua disponible o destinar parte de sus recursos para desarrollar su sistema radicular (Des Marais y Juenger, 2016).
- Escape de la sequía: consiste en que la floración puede verse inducida ante la falta de agua o, si está regulada por sus genes, puede adelantarse ante la predecible sequía de la estación estival, desarrollando con ello su ciclo vital cuando está asegurada el agua (Manzaneda *et al.*, 2015; Des Marais y Juenger, 2016; Penner *et al.*, 2020).

Mientras que las dos primeras responden a comportamientos fisiológicos (por ejemplo, cerrando los estomas), la última responde a cambios fenotípicos y es la más utilizada en las especies anuales (Penner *et al.*, 2020).

En las especies con un sistema fotosintético C3, que se encuentran en zonas áridas y muestran una estrategia basada en evitar la sequía, se produce una mayor reducción de la transpiración que de intercambio gaseoso y hay un incremento en su eficiencia en el uso del agua debido a que cierran sus estomas. Por el contrario, las que utilizan el escape a la deshidratación en ese mismo tipo de ambientes, poseen una alta tasa fotosintética y un ciclo vital mucho más acelerado, lo que conlleva a que los individuos florezcan antes para no sufrir el previsible estrés hídrico estival (Manzaneda *et al.*, 2015). Al mismo tiempo, existen diferencias en lo eficaces que pueden ser en el uso de agua las especies progenitoras de menor ploidía y sus descendientes poliploides (Manzaneda *et al.*, 2015). Un claro ejemplo de ello es *B. hybridum* que, comparado con los genotipos diploides de *B. distachyon* y utilizando ambos una estrategia de escape ante la escasez de agua, conserva una elevada conductividad estomática y tasa fotosintética, así como una floración anticipada, pero también ha adquirido una mayor eficiencia hídrica, una característica adaptativa posiblemente obtenida por su gran heterocigosis y que puede beneficiarle en su aptitud (Manzaneda *et al.*, 2015; Scholthof *et al.*, 2018).

A su vez, la adaptabilidad de la flora a condiciones ambientales de estrés abiótico ha ido evolucionando a lo largo de la historia, pudiendo haber provocado modificaciones genéticas que han dado lugar a la aparición de individuos poliploides que les ha permitido desarrollar, probablemente, una mayor capacidad para resistir a la sequía (Penner *et al.*, 2020). Además, es bastante habitual que, en ecosistemas que sufren factores ambientales adversos, exista la poliploidía y que el área geográfica entre individuos poliploides y sus padres de menor

ploidía sea diferente (Manzaneda *et al.*, 2012). Esto puede apreciarse en las especies de la familia de las poáceas, donde la aloploidía ha sido un factor importante en su historia evolutiva (70-80% del conjunto son especies aloploides) y, dentro de *Brachypodium*, existen 10 especies diploides y 10 aloploides (Ozdemir *et al.*, 2008; Scholthof *et al.*, 2018). Dado esto, *Brachypodium* se convierte también en una especie modelo mediante el cual investigar mejor la aloploidía y su historia evolutiva (Scholthof *et al.*, 2018).

1.4.3. Aumento de las concentraciones de CO₂

En cuanto a los factores de intercambio gaseoso, un aumento en la concentración de CO₂ produce una disminución de la conductividad estomática, pero un importante incremento de la fotosíntesis (pudiendo pasar de un 25% a un 75% en plantas C3) al elevarse los niveles de CO₂ (Kirschbaum, 2004; Ainsworth y Rogers, 2007). Pero la transpiración puede reducirse ante dicho cierre estomático (Kirschbaum, 2004). Asimismo, se podrán ver también mermados en su calidad nutritiva las especies vegetales por dicho aumento (IPCC, 2019). No obstante, los impactos adversos que causará en las plantas el incremento térmico y de la aridez pueden verse paliados por el incremento de los niveles de CO₂ debido al efecto fertilizante que tiene en plantas C3 y que, además, mitiga los costes fotorrespiratorios. Por otro lado, disminuye la conductividad estomática de las plantas C3 y C4, elevando con ello la eficiencia en el uso del agua (Lobell y Gourdj, 2012).

En definitiva, **las hipótesis** que se abordan en este trabajo son que los **individuos poliploides de *B. hybridum* tendrán un mayor nivel adaptativo a las condiciones futuras de cambio climático que las poblaciones diploides de *Brachypodium*** a consecuencia de los efectos de hibridación y duplicación del genoma, manifestando también una mayor conductividad estomática, un elevado intercambio gaseoso y una floración temprana con respecto a sus progenitores *B. distachyon* y *B. stacei*. Se espera también que el déficit hídrico limite la fotosíntesis para los tres sujetos de estudio, especialmente en el gradiente de aridez, donde el estrés hídrico será más acusado por el cambio climático mientras que, en las zonas donde haya continua disponibilidad de agua en el suelo dará lugar a un aumento de la fotosíntesis. Además, se puede predecir que el incremento de CO₂ a niveles de cambio climático dará lugar a un desarrollo acelerado de los individuos (ciclo de vida rápido), así como a una mayor presencia de inflorescencias que derivarán en una gran producción de semillas. Por otro lado, se espera que la temperatura elevada y el estrés hídrico sean factores limitantes en el proceso reproductivo y sus rendimientos, pero que favorezca la especialización en un uso eficiente del agua.

2. Objetivos

- El objetivo general de este trabajo es comprender el efecto aditivo y relativo de los factores principales de cambio climático (incremento del CO₂ y temperatura y reducción de agua) sobre la fisiología de intercambio de gases y relaciones hídricas en el complejo de especies de gramíneas C3 *Brachypodium distachyon* que varían en el nivel de ploidía. Debido a los efectos de hibridación y duplicación del genoma, se predice que los linajes poliploides tendrán una mayor capacidad de adaptación a las condiciones futuras que sus predecesores diploides.
- Un segundo objetivo del trabajo es evaluar los efectos del cambio climático sobre el potencial reproductivo de la especie en términos la probabilidad de floración y tiempo de floración, un factor clave en la adaptabilidad al cambio climático por vía del escape temporal a la sequía.

3. Materiales y métodos

3.1. Proceso experimental

Para llevar a cabo la siguiente investigación, han sido necesarias las semillas de 100 accesiones (ecotipos) de las diferentes especies anuales del género *Brachypodium* que constituyen poblaciones asentadas a lo largo del Mediterráneo (**Tabla 1**). De manera más específica, se han utilizado 30 genotipos de *B. distachyon*, 57 genotipos de *B. hybridum* y 13 genotipos de *B. stacei* (**Figura 3**).

La procedencia de este material han sido las colecciones del Departamento de Biología Animal, Vegetal y Ecología de la Universidad de Jaén. En la Tabla 1, se indican también las coordenadas y lugares de origen de las poblaciones a las que pertenecen.

GENOTIPO	SP	LATITUD	LONGITUD	POBLACIÓN
abr 4	BD	42.2579574	0.7213113	AREN
abr 5	BD	42.5692515	-0.549372	JACA
abr 6	BD	42.5697418	-2.1923085	LOS ARCOS
abr 7	BD	41.537836	-4.0593894	OTERO
abr 113	BS	38.7077507	-9.1365919	LISBOA
abr 114	BS	38.7063909	1.4335266	FORMENTERA
Adi 10	BD	37.7640008	38.2764355	ADIYAMAN
Adi 2	BD	37.7640008	38.2764355	ADIYAMAN
Alsur 1	BS	37.098183	-2.1239548	SORBAS
Alsur 2	BS	37.098183	-2.1239548	SORBAS
Alsur 4	BS	37.098183	-2.1239548	SORBAS
Altab 1	BS	37.0498879	-2.3913774	TABERNAS
Altab 12	BS	37.0498879	-2.3913774	TABERNAS
Altab 15	BS	37.0498879	-2.3913774	TABERNAS
Altab 3	BS	37.0498879	-2.3913774	TABERNAS
Arn 1	BD	42.2579574	0.7213113	AREN
B.stacei 5 4x	BS	38.7321489	0.2310518	CABO DE NAO
B.stacei 5 S3	BS	38.7321489	0.2310518	CABO DE NAO
Bd 1-1	BD	39.213652	27.6358474	SOMA
Bd 21	BD	36.3851423	44.1938421	SALAHUDDIN
Bd 21-3	BD	36.3851423	44.1938421	SALAHUDDIN
Bd 2-3	BD	33.0955793	44.1749775	IRAQ
Bd 30	BD	37.0737362	-3.6010019	DILAR
Bd 31	BD			SINTÉTICO
Bd 3-1	BD			SINTÉTICO
BdTR 11I	BD	39.7381639	28.0401972	TURKIA
BdTR 12C	BD	39.7481806	34.6503194	TURKIA
BdTR 1I	BD	37.8413007	27.8328374	AYDIN
BdTR 2B	BD	40.0820972	31.3311358	TURKIA
BdTR 2G	BD	38.9597594	34.9249653	TURKIA
BdTR 3C	BD	36.7830333	32.962975	TURKIA
BdTR 5I	BD	38.9597594	34.9249653	TURKIA
BdTR 7A	BD	39.8205571	34.8094917	YOZGAT
BdTR 9K	BD	38.9597594	34.9249653	TURKIA
Bhyd 118-5	BH	36.78234	-2.24198	CABO DE GATA

Bhyd 118-8	BH	36.78234	-2.24198	CABO DE GATA
Bhyd 130-1	BH			SINTÉTICO
Bhyd 26	BH	38.3868998	-3.3802235	LA CIMBARRA
Cgat 4	BS	36.78234	-2.24198	CABO DE GATA
Cgat 6	BS	36.78234	-2.24198	CABO DE GATA
Copre 12	BH	37.8945899	-4.7866874	CÓRDOBA
Copre 13	BH	37.8945899	-4.7866874	CÓRDOBA
Copre 20	BH	37.8945899	-4.7866874	CÓRDOBA
Copre 4	BH	37.8945899	-4.7866874	CÓRDOBA
Copre 8	BH	37.8945899	-4.7866874	CÓRDOBA
Copre 9	BH	37.8945899	-4.7866874	CÓRDOBA
Faro 1	BH	37.0537571	-7.9319366	FARO
Faro 2	BH	37.0537571	-7.9319366	FARO
Faro 3	BH	37.0537571	-7.9319366	FARO
Faro 5	BH	37.0537571	-7.9319366	FARO
Faro 6	BH	37.0537571	-7.9319366	FARO
Faro 7	BH	37.0537571	-7.9319366	FARO
Gaz 8-1	BD	37.0611756	37.3793085	GAZIANTEP
Jcim 16	BH	38.3868998	-3.3802235	LA CIMBARRA
Jcim 18	BH	38.3868998	-3.3802235	LA CIMBARRA
Jcim 19	BH	38.3868998	-3.3802235	LA CIMBARRA
Jcim 20	BH	38.3868998	-3.3802235	LA CIMBARRA
Jcim 7	BH	38.3868998	-3.3802235	LA CIMBARRA
Jcim 9	BH	38.3868998	-3.3802235	LA CIMBARRA
Jhin 11	BH	37.7155422	-2.9987543	HINOJARES
Jhin 16	BH	37.7155422	-2.9987543	HINOJARES
Jhin 18	BH	37.7155422	-2.9987543	HINOJARES
Jhin 19	BH	37.7155422	-2.9987543	HINOJARES
Jhin 8	BH	37.7155422	-2.9987543	HINOJARES
Jhin 9	BH	37.7155422	-2.9987543	HINOJARES
Jodar 10	BH	37.8406832	-3.3548686	JODAR
Jodar 19	BH	37.8406832	-3.3548686	JODAR
Jodar 3	BH	37.8406832	-3.3548686	JODAR
Jodar 6	BH	37.8406832	-3.3548686	JODAR
Jodar 7	BH	37.8406832	-3.3548686	JODAR
Jodar 8	BH	37.8406832	-3.3548686	JODAR
Koz 1	BD	38.10503	38.631683	KOZLUK
Larva 1	BH	37.7599694	-3.2019071	LARVA
Larva 15	BH	37.7599694	-3.2019071	LARVA
Larva 18	BH	37.7599694	-3.2019071	LARVA
Larva 20	BH	37.7599694	-3.2019071	LARVA
Larva 3	BH	37.7599694	-3.2019071	LARVA
Larva 8	BH	37.7599694	-3.2019071	LARVA
Luc 1	BD	42.5824015	0.2852348	ERMITA SANTA LUCIA
Mon 1	BH	39.7957731	-5.8752585	MONFRAGUE
Mon 10	BH	39.7957731	-5.8752585	MONFRAGUE
Mon 13	BH	39.7957731	-5.8752585	MONFRAGUE
Mon 14	BH	39.7957731	-5.8752585	MONFRAGUE
Mon 2	BH	39.7957731	-5.8752585	MONFRAGUE
Mon 3	BD	41.6758836	-0.2485703	CASTEJO DE MONEGROS
Mone 2	BH	41.6758836	-0.2485703	CASTEJO DE MONEGROS
Mone 3	BH	41.6758836	-0.2485703	CASTEJO DE MONEGROS
Mone 4	BH	41.6758836	-0.2485703	CASTEJO DE MONEGROS
Mone 5	BH	41.6758836	-0.2485703	CASTEJO DE MONEGROS
Mone 6	BH	41.6758836	-0.2485703	CASTEJO DE MONEGROS
Mur 1	BD	42.3524741	0.2836808	CASTILLO DE MUR
Ros 10	BH	42.4851364	-3.8077505	ROS
Ros 7	BH	42.4851364	-3.8077505	ROS

Ros 9	BH	42.4851364	-3.8077505	ROS
Rui 1	BH	38.9775916	-2.8834555	RUIDERA
Rui 10	BH	38.9775916	-2.8834555	RUIDERA
Rui 11	BH	38.9775916	-2.8834555	RUIDERA
Rui 9	BH	38.9775916	-2.8834555	RUIDERA
S811C	BD	41.6237833	0.2775849	ZAIDIN
Uni 2	BD	42.141499	-0.4068599	ZAIDIN

Tabla 1: Genotipos empleados, especies a las que pertenecen y su geolocalización.

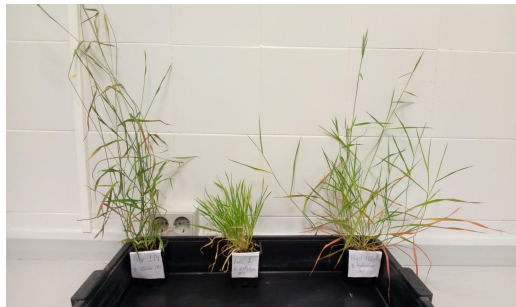


Figura 3: Ejemplos accesiones de *Brachypodium stacei* (izquierda) *Brachypodium dystachyon* (centro), y *Brachypodium hybridum* (derecha) utilizadas en este trabajo para el segundo experimento de CO₂ elevado.

Con el fin de conocer la respuesta del complejo *B. distachyon* ante los efectos aislados de cambio climático, los genotipos seleccionados fueron sometidos a dos condiciones climáticas experimentales diferentes a lo largo de su ciclo de vida (**Tabla 2**). Un primer experimento consistió en mantener un ambiente de CO₂ constante (410 ppm), siendo la temperatura el factor que se elevó 4°C para alcanzar las condiciones de calentamiento global estimadas en el futuro. Asimismo, en el segundo experimento, prevaleció una temperatura en condiciones normales mientras que, el CO₂, fue elevado hasta alcanzar los niveles de 789 ppm que se esperan en un escenario futuro. Resultados de estos experimentos se compararon con los resultados de un estudio anterior que analizó para estos mismos genotipos la variación natural en condiciones actuales y en condiciones combinadas de elevada temperatura y elevado CO₂ (Cañadilla, 2019).

Parámetros	Condiciones de temperatura elevada	Condiciones de CO ₂ elevado
CO ₂	410 ppm	789 ppm
Temperatura día	25° C	21° C
Temperatura noche	22° C	18° C
Temperatura fría del día	9° C	5° C
Humedad	50%	50%
Fotoperiodo	8/16 horas	8/16 horas

Tabla 2: Atmósferas experimentales utilizadas para cada uno de los experimentos.

Ambos se basaron en un diseño experimental llamado Split-Plot o diseño de parcelas divididas que consiste en la aleatorización de los individuos. En éste, los sujetos o unidades

experimentales se encuentran distribuidos de manera aleatoria en parcelas o bloques y están sometidos a un primer factor o varios factores. A su vez, estas parcelas conforman una parcela entera que se encuentra afectada por otro factor donde, para los diversos niveles de este segundo factor, existen parcelas replicadas (Quinn y Keough, 2002).

Teniendo en cuenta que el estudio actual es la continuación de otro anterior (Cañadilla, 2019) y que se van a computar los resultados de manera conjunta, se muestran a continuación las cuatro condiciones climáticas a las que se vieron sometidas el complejo *B. dystachyon* para ambas investigaciones (**Tabla 3**), de forma que puedan comprenderse adecuadamente los resultados que serán mostrados.

Parámetros	Estudio previo		Estudio actual	
	Atmósfera actual	Atmósfera futura	Condiciones de temperatura elevada	Condiciones de CO ₂ elevado
CO ₂	410 ppm	789 ppm	410 ppm	789 ppm
Temperatura día	21° C	25° C	25° C	21° C
Temperatura noche	18 ° C	22° C	22° C	18° C
Temperatura fría del día	5 ° C	9 °C	9° C	5°C
Humedad	50%	50%	50%	50%
Fotoperiodo	8/16 horas	8/16 horas	8/16 horas	8/16 horas

Tabla 3: *Atmósferas experimentales utilizadas en ambos estudios.*

La metodología empleada para este estudio comenzó con la selección de 8-10 semillas por genotipo, las cuales fueron colocadas en placas de Petri y, tras humedecerlas considerablemente, fueron selladas. El medio de cultivo se basó por tanto en una base de papel de filtro y agua destilada. Posteriormente, se anotaron en cada placa su genotipo correspondiente y se colocaron dentro de la cámara de cultivo (**Figura 4**), en donde las condiciones ambientales requeridas para cada experimento fueron previamente introducidas.

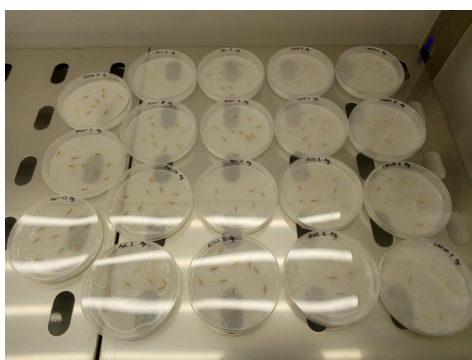
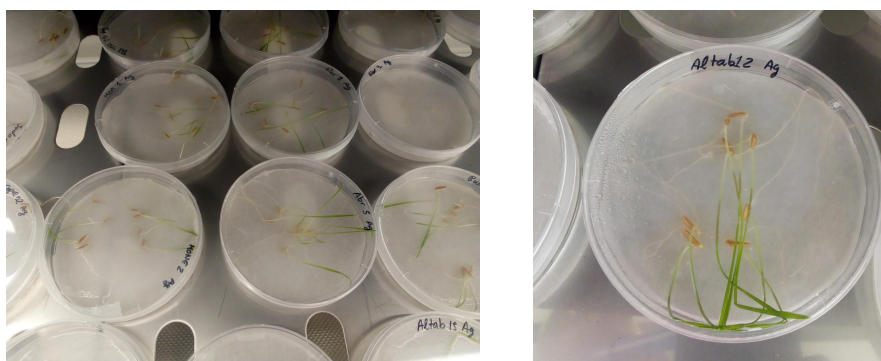


Figura 4: *Semillas de Brachypodium preparadas para su germinación.*

En un principio, fueron cubiertas para generar oscuridad pues la ausencia de luz y los factores de temperatura y humedad son los estímulos ambientales necesarios para que las semillas comiencen a germinar. Dependiendo del genotipo, el intervalo de tiempo de germinación varió entre 3 y 8 días para el primer experimento y los 2-5 días del segundo. Con la rotura de la cubierta de la semilla y la aparición de la raíz seminal, se eliminó la oscuridad para que se desarrollasen las primeras hojas y comenzasen a realizar la actividad fotosintética. Cuando tuvieron suficiente sistema radicular (**Figuras 5 y 6**), se procedió a sembrar en tierra.



Figuras 5 y 6: Plántulas de *Brachypodium* germinadas y con el desarrollo adecuado para su siembra.

Para ello, se escogieron macetas de 6x6x8cm, llegando a acoplar 48 por bandeja. El sustrato empleado consistió en una combinación de 90% de sustrato universal y 10% de perlita, siendo dicha mezcla autoclavada con anterioridad a la siembra para eliminar patógenos y evitar así posibles futuros problemas de contaminación. Posteriormente, comenzó la siembra en tierra, en donde cada uno de los individuos fueron etiquetados adecuadamente con el nombre del genotipo correspondiente (**Figuras 7 y 8**) y se sometieron a un proceso de riego semanal (aproximadamente, cada 2 días) durante un mes, con la intención de que los individuos pudieran desarrollarse correctamente y, de igual forma, se asemejara a la estación primaveral donde tienen lugar las precipitaciones y su crecimiento.



Figuras 7 y 8: Plántulas de *Brachypodium* en diferentes etapas de crecimiento tras la siembra en tierra.

Una vez transcurrido dicho periodo, se procedió a la aleatorización de los diferentes individuos mediante el diseño Split-Plot. De esta forma, para cada genotipo, se obtuvieron seis réplicas. Cada réplica de cada uno de los genotipos utilizados (**Tabla 1**) conformaron seis grandes parcelas o bloques. De entre ellos, tres bloques fueron asignados al azar a un tratamiento de riego mientras que, los restantes, serían los sometidos a estrés hídrico.

Igualmente, cuando transcurrió el mes de la siembra en tierra, fue también el momento idóneo para que comenzase el tratamiento de sequía, buscando con ello imitar el comienzo gradual de la sequía estival (**Figura 9**). De esta manera, se pudo estimar también el momento exacto para iniciar las medidas de intercambio gaseoso en este tratamiento. Para ello, se escogieron al azar 5 genotipos de cada réplica (siempre las mismas) y se pesaron diariamente con el propósito de conocer el porcentaje en peso de cada uno de ellos. De esta forma, mientras que los genotipos de las réplicas regadas mantuvieron valores cercanos al 100%, el porcentaje en peso de los genotipos en sequía fue disminuyendo cada día. Cuando alcanzaron valores próximos al 50% de peso húmedo, se dio comienzo dichas mediciones para los tres bloques de sequía.



Figura 9: Genotipos con tratamiento hídrico (izquierda) frente a individuos con estrés hídrico (derecha) del experimento de temperatura elevada.

3.2. Medidas de intercambio gaseoso

El crecimiento de las plantas viene dado por el proceso de la fotosíntesis (A) que consiste en la generación de carbono a través de la transformación de la energía luminosa en energía química. En el caso de las especies C3, para que tenga lugar la fijación del dióxido de carbono, debe de absorberse primero el CO₂ por la enzima Rubisco (Kirschbaum, 2004). Este proceso fotosintético no ofrece valores fijos para todas las especies sino que cambia según el hábitat y la especie, así como, ante las variaciones climáticas de las concentraciones de CO₂ y de temperatura (Medlyn *et al.*, 2011). Un claro ejemplo de ello es

cómo las plantas C4 se verán mayormente beneficiadas por el aumento de las temperaturas frente a las especies C3, mientras que, éstas, se verán favorecidas por el incremento de los niveles de CO₂, siendo esto algo más restrictivo para las plantas C4. A pesar de ello, el déficit de agua condiciona la tasa fotosintética de las plantas, lo cual implica que las especies vegetales cierren los estomas y reduzcan la ganancia de carbono con el fin de mantener el medio acuoso celular (Kirschbaum, 2004; Lobell y Gourdj, 2012). De igual forma, las plantas tienen un proceso que rige las relaciones entre el flujo hídrico, regulado por la transpiración, y la fotosíntesis que se conoce como conductividad estomática (*gs*) (Medlyn *et al.*, 2011).

Referente a las interacciones planta-agua, debe destacarse la eficiencia en el uso de agua (WUE) que es una medida compensatoria importante en el crecimiento vegetal y que consiste en el nexo entre la ganancia de biomasa de las plantas, gracias a la incorporación del carbono por medio de la fotosíntesis, y la transpiración (Des Marais *et al.*, 2016). También es relevante para la elección de genotipos que propicien una mejora en el rendimiento de cultivos, sobre todo en los de regadío (Ye *et al.*, 2020). Aun así, es importante señalar que los factores ecofisiológicos y de carácter genético provocan cambios en la eficiencia hídrica (Des Marais *et al.*, 2016).

La manera más usual de obtener este parámetro es realizando medidas foliares de intercambio gaseoso que, a su vez, permitirán calcular dos tipos de WUE muy empleados en el conocimiento de la conducta vegetal ante variaciones de algunos factores ambientales (Ye *et al.*, 2020). Por un lado, está la eficiencia intrínseca en el uso de agua (WUE_i), que viene definida por el ratio entre la fotosíntesis (*A*) y la conductividad estomática (*gs*), y, por otro lado, la eficiencia instantánea en el uso de agua (WUE_{inst}), que consiste en el cociente entre la fotosíntesis (*A*) y la transpiración (*E*) (Des Marais *et al.*, 2016; Lawson y Vialet-Chabrand, 2019; Ye *et al.*, 2020).

$$WUE_i = \text{Fotosíntesis (A)} / \text{Conductancia estomática (gs)}$$

$$WUE_{inst} = \text{Fotosíntesis (A)} / \text{Transpiración (E)}$$

Teniendo en cuenta la estrecha relación que tienen entre sí estos factores, las plantas responderán de diferentes formas ante el déficit hídrico y, a su vez, los efectos combinados de los niveles de CO₂ elevados y temperatura elevada (Kirschbaum, 2004). Es por ello que, para la realización de las medidas de intercambio gaseoso, fue utilizado el equipo de

fotosíntesis portátil Li-cor LI-6800 (**Figura 10**), el cual, mediante un analizador infrarrojo de gran precisión, permitió obtener información a tiempo real sobre los diferentes parámetros de interés. Asimismo, la pinza que se empleó para las mediciones fue la 1x3 SS puesto que se trata de la idónea para este tipo de gramíneas de hoja pequeña.

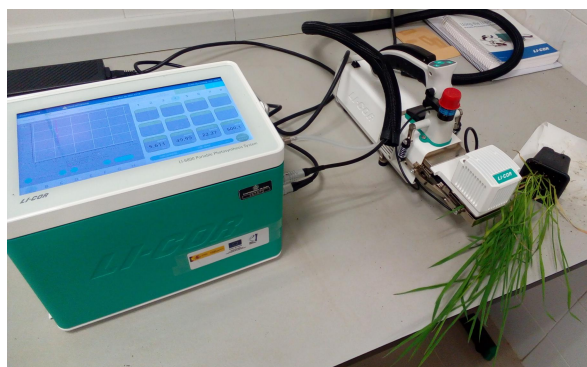


Figura 10: Individuo del bloque de riego siendo analizado por Li-cor LI-6800.

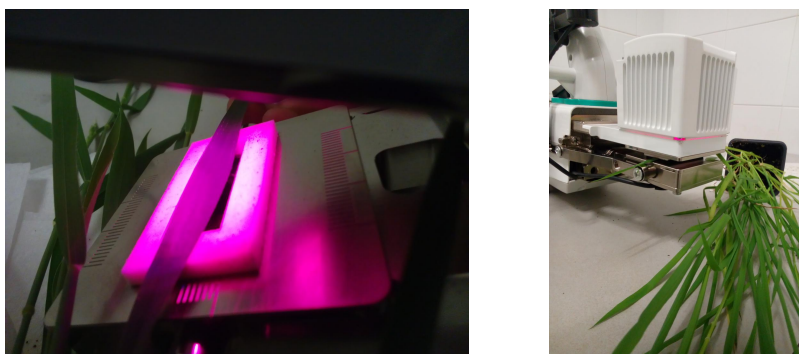
En el apartado de constantes del sistema LICOR, se introdujo la anchura de cada una de las hojas seleccionadas. Estimaciones entre este valor junto al ratio estomático ($K=0,5$ para *Brachypodium*) permitió obtener la superficie o área de la hoja de la que se estaban tomando cada medida. También se introdujeron los valores ambientales en los que debían realizarse las medidas, los cuales, correspondieron a las condiciones ambientales existentes en la cámara de cultivo. Para cada experimento, los parámetros que se fijaron en el sistema LICOR fueron los siguientes (**Tabla 4**):

Parámetros	Condiciones de temperatura elevada	Condiciones de CO ₂ elevado
Flujo	500 $\mu\text{mol/s}$	500 $\mu\text{mol/s}$
H ₂ O	50%	50%
CO ₂	410.0 $\mu\text{mol/mol}$	789.0 $\mu\text{mol/mol}$
Ventilador	1000 rpm	1000 rpm
Temperatura	25°C	22°C
Luz	600 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$	600 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$

Tabla 4: Parámetros establecidos para los experimentos de temperatura elevada y CO₂ elevado.

Una vez establecidos, se tomó la hoja deseada, se colocó en la pinza (**Figuras 11 y 12**) y se introdujo el nombre del genotipo a analizar. En total, se tomaron 6 medidas para cada genotipo durante un periodo de tiempo de 2 minutos, siendo estas tomadas en intervalos de 20 segundos, respetando unos minutos entre la colocación de la muestra y el inicio de la medida para que hubiese una estabilización de los valores de cada hoja.

Todos los datos fueron recogidos en archivos Excel para su posterior tratamiento, así como para la obtención de los valores de WUE según las fórmulas indicadas anteriormente.



Figuras 11 y 12: Introducción de una muestra a analizar en Li-cor LI-6800 (fuente de luz: 600 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ de PAR).

3.3. Medición de rasgos funcionales

Los comportamientos y respuestas que tienen las plantas ante los diversos factores ecológicos vienen definidas por una serie de peculiaridades de tipo morfológico, fenológico y fisiológico llamadas rasgos funcionales (Pérez-Harguindeguy *et al.*, 2016). Entre ellas se encuentran el área foliar específica (“*specific leaf area*” en inglés (SLA)) y el contenido relativo de agua (“*relative water content*” (RWC)).

Por un lado, el SLA consiste en el estudio de la tasa de crecimiento de las especies vegetales y viene definida por el grosor de la hoja y su contenido de extracto seco. Consiste por tanto en el ratio entre el área foliar de la hoja y su peso seco (Pérez-Harguindeguy *et al.*, 2016). Sus unidades vendrán definidas en este estudio como $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$.

$$\text{SLA} = (\text{Área foliar de la hoja}) / \text{Peso Seco}$$

De esta forma, cuando existe una exposición foliar a una elevada intensidad luminosa, se produce el máximo nivel de fotosíntesis (saturación fotosintética), implicando con ello que los valores de SLA sean ascendentes mientras que, por ejemplo, ante hojas envejecidas, serán descendentes (Pérez-Harguindeguy *et al.*, 2016).

Por otro lado, el RWC se trata de un indicador de la condición hídrica de la planta en el que se relaciona la absorción de agua y las pérdidas derivadas por el proceso de transpiración, permitiendo conocer así las variaciones del volumen celular vegetativo (González y González-Vilar, 2001). Igualmente, se define también al contenido relativo de agua de las hojas como una medida que expresa su escasez hídrica (Lugojan y Ciulca,

2011). Dicho de otro modo, se refiere al contenido en agua que tienen los tejidos de la hoja recién sustraída de la planta (peso húmedo) y el peso que tiene tras sometida a un proceso de deshidratación (peso seco).

$$RWC = (\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}) / \text{Peso fresco}$$

El RWC viene definido por un valor porcentual y, aunque rondan entre el 60-70% en casi todos los cultivos, los contenidos relativos hídricos normales se encuentran entre el 98% y el 40% (respectivamente, hace referencia a hojas que poseen turgencia y muy deshidratadas) (González y González-Vilar, 2001; Lugojan y Ciulca, 2011).

El desarrollo de estas medidas comenzó con la elección y extracción de la hoja de mayor porte como muestra representativa del individuo y se guardó en un sobre donde se indicó el genotipo, el tipo de tratamiento y el bloque al que pertenecían. Posteriormente, cada muestra se pesó en una balanza de precisión para obtener su peso fresco.

Para tomar las medidas de SLA fue utilizado el medidor de área de hojas portable LI-COR 3000C Biosciences Inc. (**Figura 13**). Para ello, se colocó la muestra fresca en una funda transparente que actuó de apoyo y se pasó perpendicularmente por el cabezal mientras se tiraba con lentitud del cable codificador para que realizara la medida. Este procedimiento se repitió tres veces para cada hoja. De este modo, se obtuvieron tres valores de área foliar por individuo de los cuales se realizó un valor promedio para cada genotipo-réplica.



Figura 13: Medidor de SLA LI-COR 3000C.

Con la finalidad de conocer también el RWC, se guardaron todas las muestras sustraídas en una estufa durante un tiempo mínimo de 4 días y a una temperatura de 60°C, permitiendo con ello que el agua almacenada en cada hoja fuese eliminada. Trascurridos

ese periodo de tiempo, se volvieron a pesar para obtener su peso en seco y se realizaron los cálculos pertinentes para cada rasgo funcional.

3.4. Floración

Una vez realizadas las mediciones de intercambio gaseoso y de los rasgos funcionales, se continuó con ambos tratamientos y con las condiciones ambientales definidas para cada experimento, buscando conocer cuáles serían los individuos y/o genotipos que sobrevivirían bajo condiciones de estrés hídrico y, de manera general, cuáles culminarían con éxito su ciclo vital. Para ello, se controló a los individuos para determinar el momento en que apareciera la primera inflorescencia (**Figuras 14 y 15**). Es decir, se calculó el periodo de tiempo transcurrido desde que germinaron hasta que empezaron a florecer.



Figuras 14 y 15: Inflorescencias juveniles de *Brachypodium* en la cámara de cultivo.

La floración tiene lugar cuando se producen cambios en las condiciones climáticas que las plantas son capaces de captar, produciendo con ello una redistribución de los recursos, pasando de ser utilizado en la producción foliar a ser destinados para la formación flores y semillas. La respuesta asociada con la transición entre la etapa de crecimiento y el periodo de floración es diferente según la especie pues, mientras que unas florecen ante variaciones del fotoperiodo, otras necesitan un periodo de frío extenso con el que poder estimular la floración (vernalización). (Schwartz *et al.*, 2010). Es por ello que al haber genotipos que requieren de vernalización para poder inducir su periodo reproductivo, en ambos experimentos, se redujo a 7°C la temperatura de la cámara cuando se estimó oportuno.

Una vez que las semillas de las inflorescencias llegaron a un estadio maduro (**Figuras 16 y 17**), se llevó a cabo su recolección, contabilizando el número de inflorescencias en cada individuo, el número de espiguillas que se formaron en cada una de ellas y el número de semillas viables (maduras). Esto último es de especial interés debido a que hubo

inflorescencias cuyas semillas fueron inmaduras e, incluso, individuos y genotipos que no florecieron, indicando con ello que puede ser un factor limitante para su prevalencia futura.



Figuras 16 y 17: Semillas de *Brachypodium* madurando (derecha) y completamente maduras (izquierda).

3.5. Análisis estadístico

A partir de los datos obtenidos en ambos estudios, se generó una base de datos conjunta con la que poder analizar las respuestas del complejo *Brachypodium distachyon* para los cuatro climas analizados en este y el estudio previo (actual, futuro de cambio climático, con concentraciones elevadas de CO₂ pero temperatura actual y temperatura elevada pero con niveles de CO₂ actuales) y los dos regímenes hídricos (riego y sequía) a las que se expusieron. Para ello, se empleó el software estadístico RStudio. En primer lugar, fueron utilizados los paquetes “ggplot2” y “ggpubr”, para realizar representaciones gráficas de cada rasgo fisiológico y funcional. Éstos consistieron en histogramas (**Anexo I**) con los que conocer la distribución de los datos (si se ajustaban o no a una distribución normal) y box plot o diagramas de caja, con los que efectuar comparaciones entre climas y tratamientos. En segundo lugar, se sirvió de los paquetes “lme4”, “lmerTest” y “emmeans” para realizar modelos lineales mixtos generalizados (GLMMs) y, para la descomposición de la varianza, se empleó el paquete VCA. Por último, para conocer el tiempo de floración y supervivencia de las especies, se emplearon los paquetes “survival”, “ranger”, “ggplot2”, “dplyr”, “ggfortify”, “survminer”, “MASS” y “cmprsk”.

Para analizar el efecto del clima y del tratamiento de sequía, se usó por un lado un modelo de incidencia acumulada para cada una de las condiciones de clima tanto a nivel general como para cada una de las especies. Así, en cada una de las condiciones climáticas se comparó la probabilidad de que ocurra la floración a lo largo del ciclo vital para plantas en situación de sequía y de riego normal. Para comparar entre tratamientos se usó el estadístico de Gray que permite analizar la comparación entre grupos en curvas de

incidencia acumulada usando la función *cuminc* el paquete de R “cmprsk”. Por otro lado, se ajustaron modelos de proporción de riesgos de Cox, de nuevo para cada uno de los ambientes y especie. En estos modelos se analizó el efecto del tratamiento de sequía sobre el tiempo de floración y la probabilidad de floración. Para ello se usó la función *coxph* en el paquete de R “survival”.

4. Resultados

4.1. Rasgos de intercambio gaseoso y rasgos funcionales

Existe un efecto significativo del clima sobre la fotosíntesis, sin embargo, este efecto no fue independiente del régimen de riego ni de la especie, tal y como se desprende de la existencia de interacciones significativas entre el clima y el tratamiento, y el clima y la especie (**Tabla 5**). La interacción significativa clima x tratamiento indica que los niveles de variación del clima sobre la fotosíntesis fueron dependientes del régimen de agua (**Tabla 5**). En particular, en condiciones atmosféricas y de temperatura actuales y futuras (CO₂ elevado y temperatura elevada), la fijación de carbono fue siempre significativamente mayor en condiciones de riego frente a aridez y esto fue constante para las tres especies sujetas de estudio (**ver figura 18**). La fijación de carbono por parte de las plantas fue máxima en condiciones de riego normal bajo clima de cambio climático, y fue mínima en condiciones atmosféricas actuales en un régimen de sequía. De manera llamativa, se observa, una mejora en la fijación de carbono en las plantas que son sometidas a sequía bajo un ambiente de crecimiento de atmósfera futura respecto a las plantas que crecen en sequía en condiciones atmosféricas actuales, y eso es consistente entre especies.

En condiciones de CO₂ elevado, y temperatura actual, para *B. distachyon* y *B. hybridum*, el régimen de riego sí influyó significativamente sobre la fijación de carbono, donde plantas sometidas a estrés hídrico mostraron valores significativamente superiores de fotosíntesis (**Figura 18**). Este, sin embargo, no fue el caso para *B. stacei*. En condiciones de temperatura elevada, y CO₂ actual, de nuevo la capacidad de fijación de carbono estuvo determinada por la disponibilidad de agua. En este caso, para las tres especies, las plantas sometidas a sequía, vieron reducida de manera significativa su capacidad para realizar la fotosíntesis comparado con las plantas que crecieron sin restricciones hídricas (**Figura 18**). Por otro lado, existió un efecto significativo de la interacción entre el régimen de riego y la especie, que indicaba que el efecto de la restricción de agua no afectó de la misma manera a las tres especies, aunque está algo influenciado por las condiciones climáticas de crecimiento, tal y como señala la triple interacción Clima x Tratamiento x Especie (**ver Tabla 5**). Por último, señalar, que el origen geográfico de las plantas también influyó significativamente en la capacidad fotosintética.

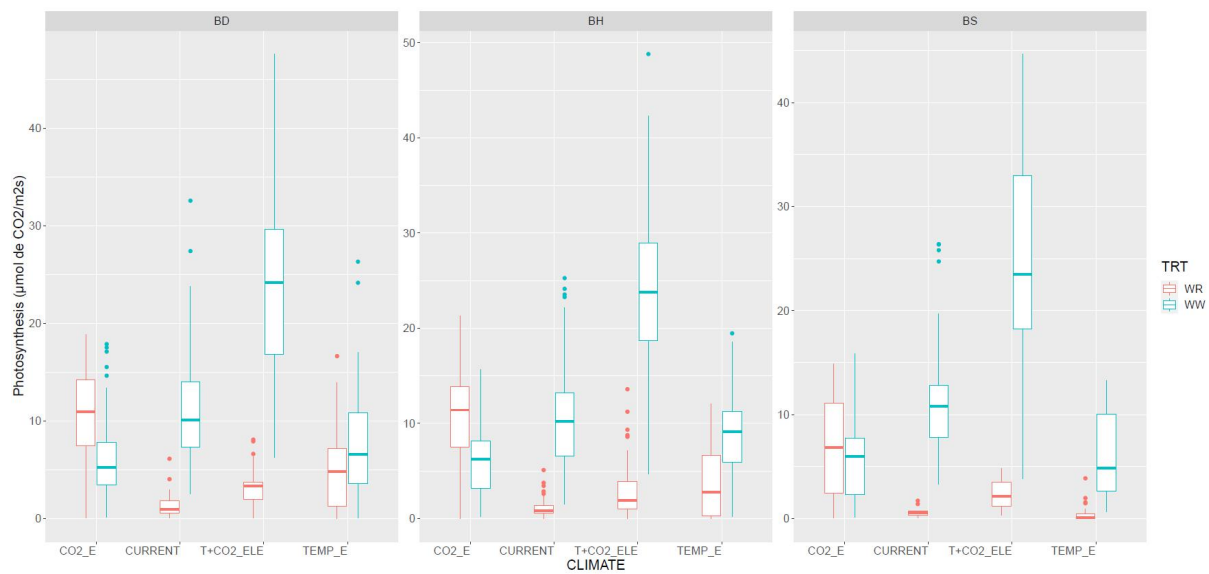


Figura 18: Box plot para el rasgo fotosíntesis.

En términos relativos, es el tratamiento el factor más importante para explicar la variación observada en la tasa fotosintética (**Figura 19**). Así, tanto como factor principal, como a través de las interacciones con el clima y la especie explica de manera acumulada un 70% de la varianza observada en este rasgo (**Figura 19**).

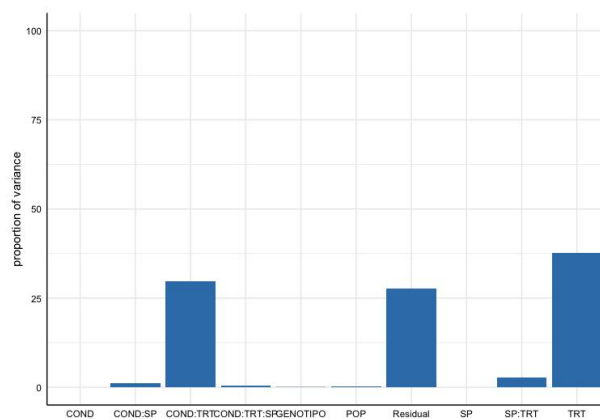


Figura 19: Descomposición de la varianza para la fotosíntesis.

	RASGOS														
FACTOR	FOTOSÍNTESIS			CONDUCTIVIDAD ESTOMÁTICA			WUE _{INT}			SLA			RWC		
Efectos Fijos	<i>g.l.</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>g.l.</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>g.l.</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>g.l.</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>g.l.</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Clima	3,1760	84.31	<0.0001	3,1744	68.43	<0.0001	3,1757	271.74	<0.0001	3,1512	7.09	<0.0001	3,1514	290.88	<0.0001
Tratamiento (TRT)	1,1733	863.46	<0.0001	1,1717	274.8	<0.0001	1,1732	2.49	0.11510	1,1523	36.74	<0.0001	1,1492	59.44	<0.0001
Especie (SP)	2,42	9.56	0.0004	2,46	2.63	0.082	2,30	5.37	0.01000	2,203	1.47	0.231	2,31	7.8	0.0017
Clima x TRT	3,1729	216.62	<0.0001	3,1715	116.12	<0.0001	3,1728	7.24	<0.0001	3,1501	30.71	<0.0001	3,1483	25.9	<0.0001
Clima x SP	6,1760	5.57	<0.0001	6,1745	8.25	<0.0001	6,1757	1.99	0.06399	6,1504	5.68	<0.0001	6,1518	2.17	0.043
TRT x SP	2,1732	15.2	<0.0001	2,1718	6.41	0.0016	2,1732	0.0099	0.99013	2,1491	0.22	0.8	2,1487	4.83	0.008
Clima x TRT x SP	6,1727	1.97	0.06	6,1714	5.62	<0.0001	6,1726	6.25	<0.0001	4,1478	1.57	0.179	3,1488	0.44	0.72
Efectos Aleatorios	<i>g.l.</i>	<i>LRT</i>	<i>P</i>	<i>g.l.</i>	<i>LRT</i>	<i>P</i>	<i>g.l.</i>	<i>LRT</i>	<i>P</i>	<i>g.l.</i>	<i>LRT</i>	<i>P</i>	<i>g.l.</i>	<i>LRT</i>	<i>P</i>
Población (POP)	1	3.95	0.046	1	7.39	0.006	1	0.28	0.597	1	0	1	1	3.96	0.046
Genotipo (SP)	1	0.08	0.776	1	10.85	0.0009	1	3.65	0.056	1	53.9	<0.0001	1	1.75	0.18

Tabla 5: Resultados obtenidos mediante modelos lineales mixtos generalizados (GLMMs) para los procesos de intercambio gaseoso y los rasgos funcionales en relación con los efectos fijos y aleatorios de los experimentos realizados.

Respecto a la conductividad estomática, ésta estuvo significativamente afectada por el clima, aunque de nuevo, su efecto no fue independiente del tratamiento de riego y de la especie, tal y como refleja la triple interacción Clima x Tratamiento X Especie (**Tabla 5**). Con la excepción de las atmósferas enriquecidas en CO₂ y temperatura actual, para el resto de condiciones climáticas, la conductividad estomática de plantas creciendo en condiciones de disponibilidad hídrica fue significativamente superior que las plantas creciendo en condiciones de sequía. Este patrón fue consistente entre especies, variando la magnitud de este efecto. La conductividad estomática fue máxima en *B. stacei* en condiciones de no restricción hídrica, y mínima para condiciones actuales en régimen de sequía (**Figura 20**). De manera llamativa, en condiciones de CO₂ elevado y temperatura actual, las plantas de *B. distachyon* y *B. hybridum* tendieron a mostrar mayor conductividad estomática en condiciones de sequía respecto a plantas que crecieron en condiciones con disponibilidad de agua (**Figura 20**). No fue el caso para *B. stacei* donde no hubo diferencias entre tratamientos en este rasgo y en estas condiciones atmosféricas de CO₂ elevado y temperatura constante.

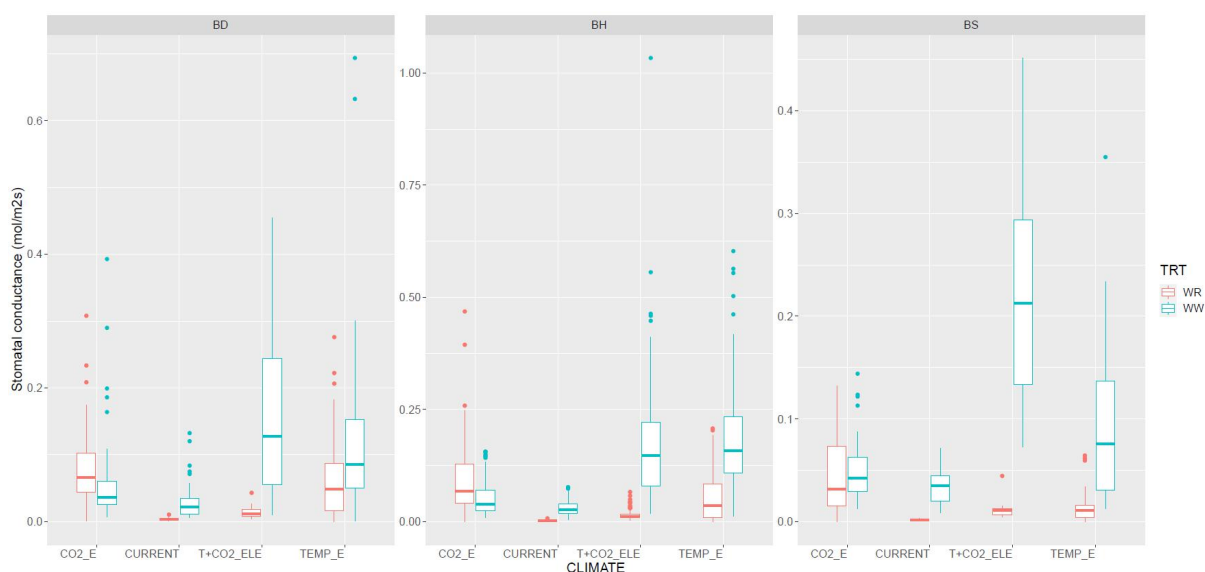


Figura 20: Diagrama de cajas para la conductividad estomática.

En términos relativos, de nuevo fue el tratamiento el factor que determinó en mayor media la variación observada en la conductividad estomática, si bien en este caso principalmente a través de su interacción con el clima (31.8%) más que como efecto principal (14.98%) (**Figura 21**).

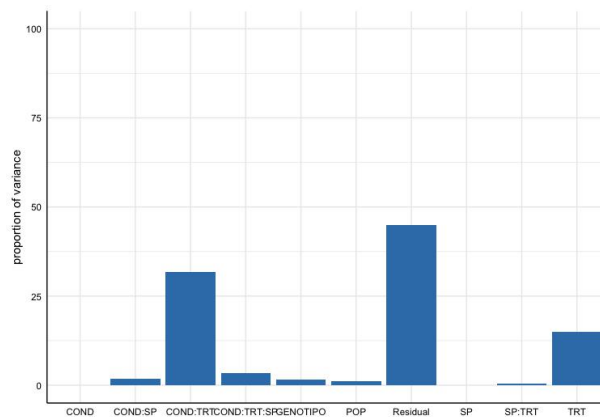


Figura 21: Descomposición de la varianza para la conductividad estomática.

En definitiva, **para esto rasgos de intercambio de gases, se intuye un patrón de aditividad de los efectos climáticos sobre la fotosíntesis y la conductividad estomática. Esta aditividad proviene por un lado de los efectos compensatorios del CO_2 sobre la fotosíntesis y la conductividad estomática en condiciones de sequía, es decir, el incremento de CO_2 amortigua la caída en la tasa de fijación de carbono en las plantas sometidas a estrés hídrico sobretodo en condiciones de temperatura actuales y CO_2 elevado.** Por otro lado, existe un efecto de mejora de la tasa fotosintética (al menos para dos de las tres especies) por el aumento de la temperatura.

El WUE intrínseco estuvo afectado principalmente por las condiciones climáticas, tanto como efecto principal, como a través de la interacción con el tratamiento, si bien esta última ha dependido en gran medida de la especie, tal y como refleja la significación de la triple interacción Clima x Tratamiento x Especie (**Tabla 5**). Así, de manera general, la WUE fue significativamente mayor en plantas creciendo en condiciones de clima actual y disminuyó relativamente en todas las condiciones climáticas restantes (**Figura 22**), aunque la magnitud de dicha variación dependió de la especie y el tratamiento (**Figura 22**). De esta manera, mientras que para *B. distachyon*, en condiciones de clima actual, la eficiencia en el uso del agua fue significativamente menor en las plantas sometidas a sequía frente a las plantas que crecían en un régimen de riego normal, para *B. hybridum* y *B. stacei* no se observaron diferencias significativas. En condiciones de CO_2 elevado, no se observaron diferencias en WUE entre plantas sometidas a estrés hídrico y plantas crecidas sin limitación de agua para ninguna de las tres especies del estudio (**Figura 22**). Este fue también el mismo caso para las plantas expuestas a una temperatura elevada y de cambio climático. El análisis de descomposición de la varianza determinó que fue el clima el factor que explicó en una mayor proporción (48.72%) la variación en WUE observada (**Figura 23**).

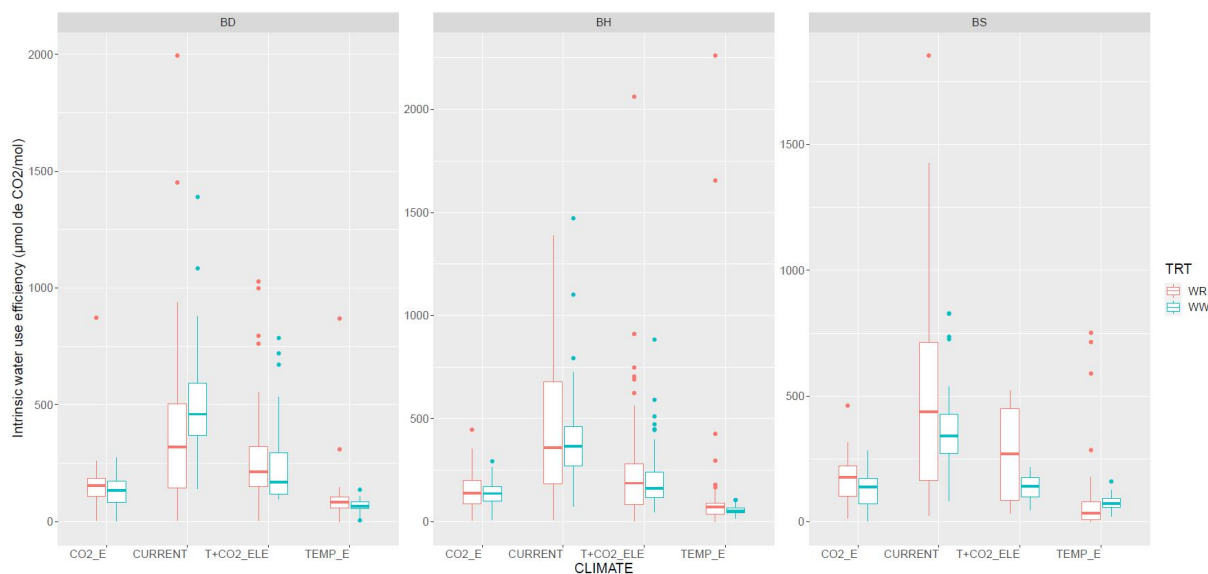


Figura 22: Diagrama de cajas para la eficiencia intrínseca en el uso del agua (WUE_i).

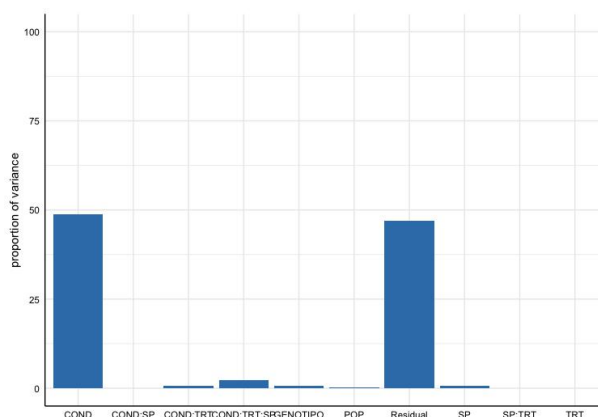


Figura 23: Descomposición de la varianza para el WUE intrínseco.

En relación con el SLA, hay un efecto significativo del clima sobre el rasgo, tanto como un efecto simple, como a través de la interacción con el tratamiento y de el clima con la especie (**Tabla 5**). Una tendencia constante en las tres especies y en todos los climas, exceptuando en las condiciones de CO_2 elevado y temperatura actual, es que el SLA ha sido significativamente superior en los individuos que crecieron con régimen hídrico que en las plantas que lo hicieron en ausencia de agua (**Figura 24**). Aunque la magnitud del efecto de la interacción clima x tratamiento difiere entre especies. Además, con respecto al clima actual, se repite la tendencia de un menor SLA en las tres anuales (**Figura 24**). De esta manera, *B. stacei* tuvo las mayores áreas foliares específicas en condiciones de cambio climático y con régimen de riego, mientras que los individuos de *B. distachyon* mostraron los mínimos SLA medidos en clima actual y sequía. Por otro lado, las plantas de *B. stacei* y *B. hybridum* que crecieron en las mismas condiciones, no llegaron a sobrevivir en el momento de tomar las medidas (**Figura 24**). Asimismo, en condiciones de CO_2 elevado y

temperatura actual, no existieron diferencias entre tratamientos, tendencia que se repite en las tres especies. En condiciones de temperatura elevada y CO₂ actual, *B. hybridum* ha tenido las mayores superficies foliares en ambos tratamientos y el mínimo SLA en condiciones actuales y régimen hídrico, así como, en el clima futuro de cambio climático y con limitación de agua.

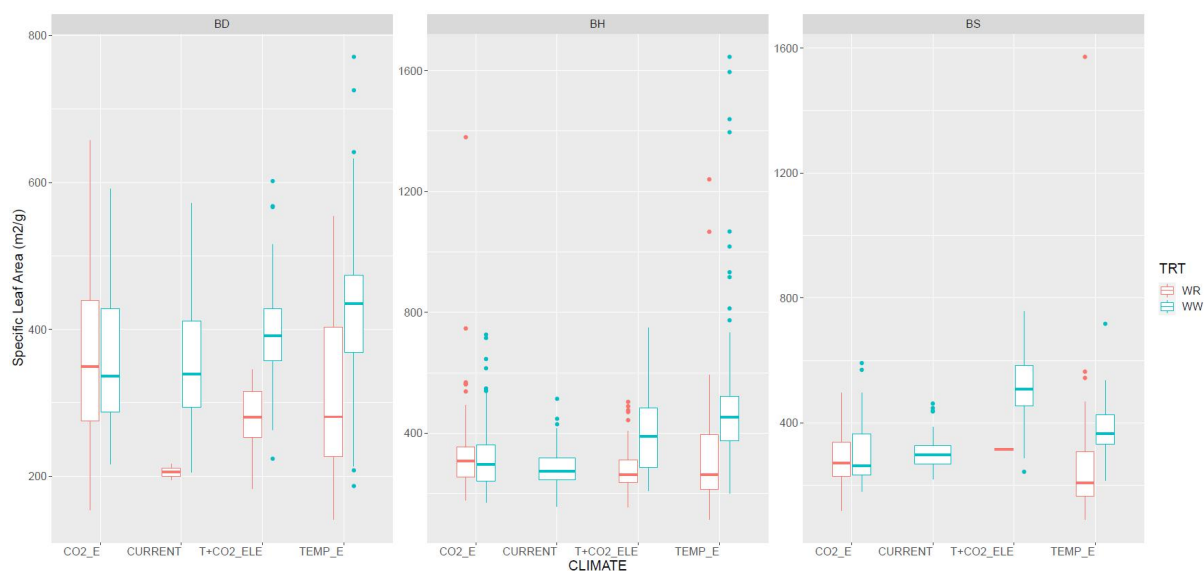


Figura 24: Box plot para el área foliar específica (SLA).

En términos relativos, nuevamente es el factor “tratamiento” el de mayor relevancia, pues es el que mejor explica la varianza observada para el área foliar específica (17.26%). A pesar de ello, no es el único dado que su interacción con el clima llega a explicar el 11.74% de la varianza observada (**Figura 25**).

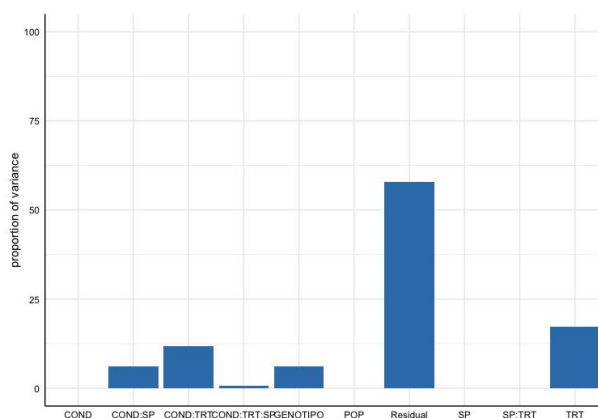


Figura 25: Descomposición de la varianza para el SLA.

Por último, el contenido relativo de agua se encontró significativamente afectado por el clima, tanto como efecto principal como por medio de las interacciones significativas entre el

clima x tratamiento y el clima x especie (**Tabla 5**). A nivel general, el RWC difirió mucho entre climas y hubo un efecto significativo entre régimen de riego y sequía, aunque su magnitud difirió entre especies. De esta manera, las plantas cuyo crecimiento no estuvo sujeto a restricciones hídricas han mostrado un RWC significativamente mayor que las plantas que lo hicieron con limitación de agua (**Figura 26**). De igual manera, en condiciones de temperatura elevada y CO₂ actual el régimen hídrico fue mayormente significativo en las tres especies, dando lugar a un gran rango diferencial entre las plantas con régimen de riego y sin él.

Junto a estas condiciones ambientales, en condiciones de CO₂ elevado y temperatura actual, los RWC fueron significativamente superiores que en el resto de climas, maximizándose en las plantas que crecieron en régimen de riego y clima de temperatura elevada y CO₂ actual. En cambio, en condiciones de sequía y tanto en clima actual como futuro, el RWC fue mínimo, e incluso no pudo medirse en algunos casos. En condiciones de temperatura elevada y CO₂ actual, *B. stacei* es el que más afectado ha estado en condiciones de sequía y en cualquier clima mientras que *B. hybridum* muestra los mayores RWC tanto en plantas con disponibilidad de agua durante su crecimiento como en plantas que lo hicieron sometidas a sequía, siendo esto constante en los cuatro climas estudiados. Por otro lado, *B. distachyon* muestra contenidos relativos de agua intermedios pero que siguen la misma tendencia que la de *B. hybridum*, tanto en clima como en tratamiento (**Figura 26**).

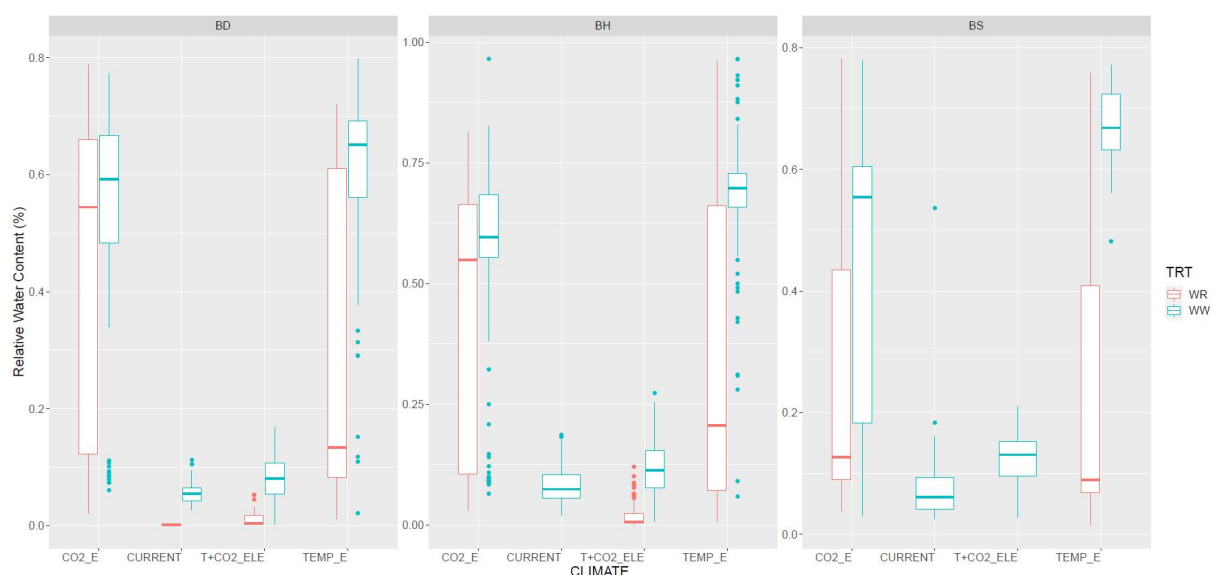


Figura 26: Diagrama de cajas para el contenido relativo de agua (RWC).

En este caso, el análisis de descomposición de la varianza determinó que, para el contenido relativo de agua, el factor principal es el clima, llegando a explicar el 52.95% de la

varianza observada. Seguido a él, aunque en menor medida, el tratamiento explica el 13.18% de la varianza observada y, la interacción entre ambos, un 5.03% (**Figura 27**).

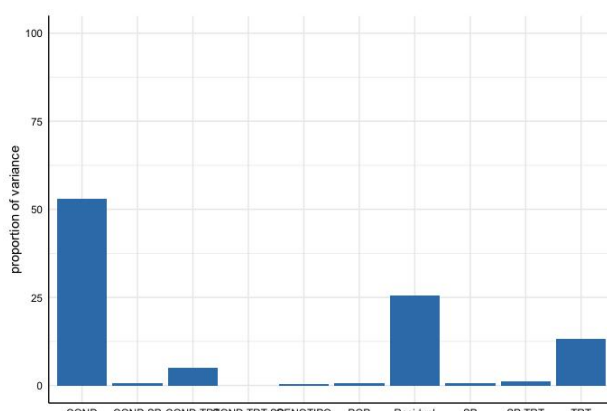


Figura 27: Descomposición de la varianza para el RWC.

4.2. Tiempo de floración

En términos generales, para las cuatro condiciones climáticas, han existido diferencias significativas entre las plantas regadas (WW) y las sometidas a estrés hídrico (WR), difiriendo la magnitud según el clima, lo cual indica que el tiempo de floración para el conjunto de las especies varía en función del tratamiento y el clima (**Figura 28**). En concreto, para un clima como el actual, las plantas que crecieron sometidas a sequía tardaron de media 37.8 días en florecer mientras que el periodo de tiempo desde la germinación hasta la floración de las plantas con disponibilidad hídrica fue 49.1 días de media (**Tabla 6**). A pesar de que la floración se adelanta en WR, las plantas bien regadas tienen 1.53 veces más riesgo de florecer a lo largo de su ciclo vital que aquellas plantas con restricciones de agua, siendo de dicha probabilidad de 0.55 en el caso de WW y 0.37 para WR.

	GENERAL		<i>B. distachyon</i>		<i>B. hybridum</i>		<i>B. stacei</i>	
	Disponibilidad hídrica							
<i>Clima</i>	<i>WR</i>	<i>WW</i>	<i>WR</i>	<i>WW</i>	<i>WR</i>	<i>WW</i>	<i>WR</i>	<i>WW</i>
Actual	37.8	49.1	40.3	79.3	37.28	47.9	39.03	38
Cambio climático	36.9	70.72	-	105.2	37.5	70.7	35.78	41
Temperatura elevada	126.5	125.7	137.2	129.2	131	136.8	94.5	87.5
CO ₂ elevado	82.16	95.4	76.8	116.8	85.9	101.8	77.2	70.7

Tabla 6: Tiempo de floración (número de días) observado desde la germinación.

En condiciones de cambio climático se acentúa esta tendencia, especialmente para las plantas con régimen de riego, en donde se produce un retraso significativo en el tiempo de floración (70.72 días promedio) con respecto a las que crecieron en condiciones climáticas actuales y bajo el mismo tratamiento (**ver Figura 28 y Tabla 6**). Por el contrario, la floración de las plantas sometidas a estrés hídrico continuó casi con la misma tendencia que en WR del clima actual, siendo el tiempo de floración 36.9 días de media (**Tabla 6**). Debe destacarse que, aún existiendo diferencias significativas entre tratamientos, éstas son menores que para el resto de condiciones climáticas ($p=0$). De igual forma, la magnitud de la probabilidad de floración en WW sufre un fuerte incremento significativo en este clima de cambio climático, de tal forma que las plantas con régimen de riego normal tienen 4.81 veces más riesgo de florecer durante su ciclo de vida que las que están sometidas a sequía. En términos específicos, dicha probabilidad es de 0.14 para WR y 0,54 para WW.

Para condiciones de temperatura elevada, y niveles de CO₂ actuales, se observa una influencia directa de la temperatura sobre el tiempo de floración, produciendo un fuerte retraso de la floración para ambos tratamientos en comparación con los tiempos del clima actual e, incluso, con condiciones de cambio climático (**Figura 28**). Asimismo, aunque existen diferencias significativas entre WW y WR ($p=1.767342e^{11}$), sus tiempos de floración apenas difieren entre ellos. Para plantas que crecieron sometidas a estrés hídrico su tiempo medio floración fue de 126.5 días mientras que, para las que dispusieron de agua, fue de 125.7 días (**ver figura 28 y Tabla 6**). Continuando con los comportamientos anteriores, son estas últimas las que tienen mayor probabilidad de floración (0.455) frente a las de WR (0.2). Específicamente, las plantas en WW tienen 2.74 veces más riesgo de florecer durante sus vidas que las que están con tratamiento de sequía.

En contraposición con el resto de climas, para condiciones de CO₂ elevado y temperatura actual, se produce una inversión de la tendencia en la floración, posiblemente por el factor de fertilización que tiene el CO₂ (**ver Figura 28**). Nuevamente, los tiempos de floración del conjunto de especies vuelven a retrasarse, aunque no de una manera tan marcada como ocurre en condiciones de temperatura elevada y concentraciones de CO₂ actuales. Asimismo, las diferencias significativas entre tratamientos ($p=0.003513$) pueden observarse en que las plantas con riego tendieron a florecer a los 95.4 días de media desde el comienzo de la germinación mientras que, en el caso de las plantas que crecieron con régimen de sequía, adelantaron su floración con respecto a las de WW, tardando 82.16 días de media de florecer (**Tabla 6**). Por otro lado, como se ha señalado antes, el riesgo de floración se invierte para estas condiciones climáticas pues, en este caso, las plantas con régimen de riego presentan 0.56 veces menor riesgo de florecer que las plantas que

crecieron con estrés hídrico. Es decir, existe una mayor probabilidad de floración en WR que en WW.

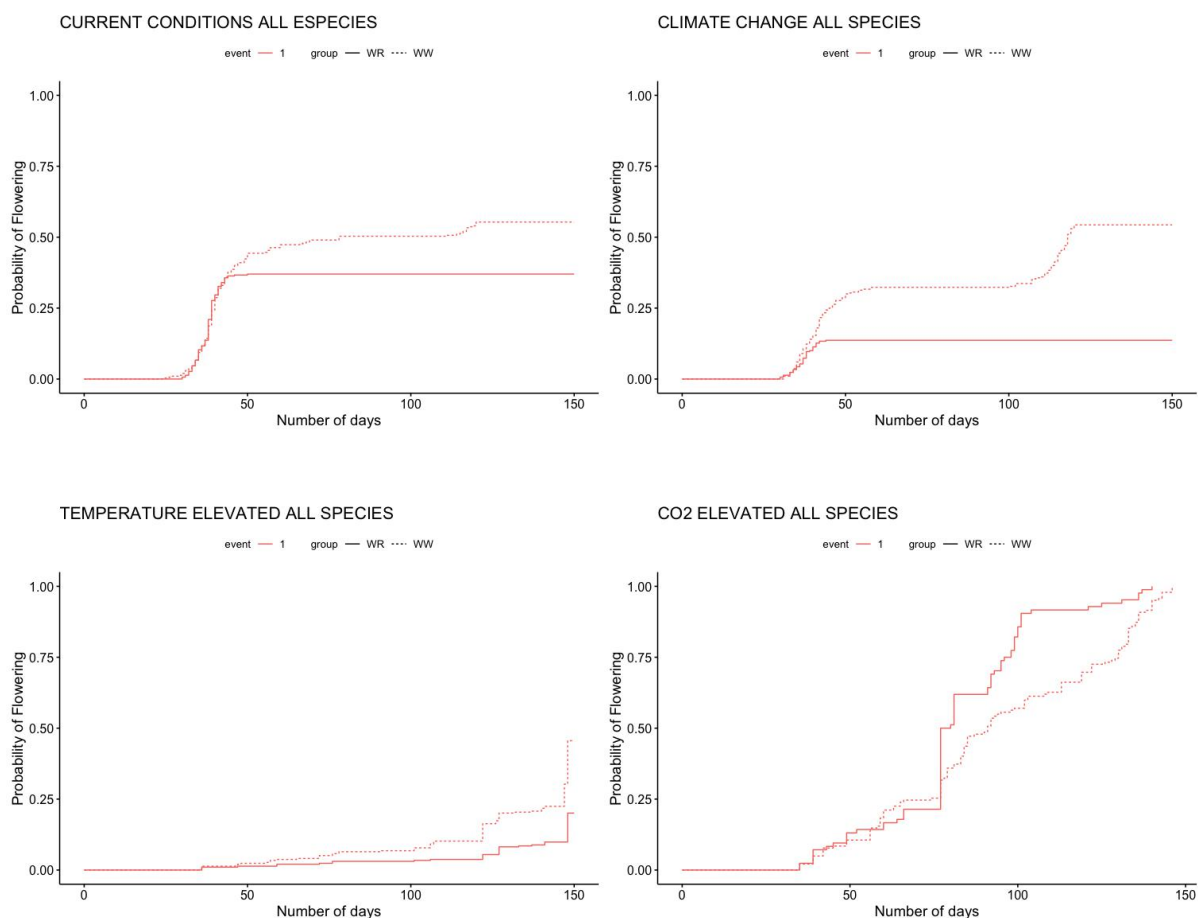


Figura 28: Tiempo de floración general de todos los individuos bajo tratamiento de riego (WW) y de sequía (WR) y ante cada una de las condiciones ambientales estudiadas.

En términos relativos, para la especie *B. distachyon* han existido diferencias significativas entre WR y WW en cada una de las condiciones climáticas. En clima actual, las plantas que crecieron con régimen de riego normal mostraron una floración tardía (79.3 días de media) en relación a las plantas con tratamiento de sequía (40.3 días promedio) pero, sobre todo, con respecto a las plantas de *B. hybridum* y *B. stacei* en WR y WW y mismo clima (**ver Tabla 6**). Esto es debido a que la especie *B. distachyon* tiene genes de vernalización que implican la necesidad de un periodo de frío para poder florecer, provocando una floración más tardía que en el resto de especies. Por otra parte, aunque las plantas con disponibilidad de agua muestren este comportamiento significativo, tienen 6 veces más riesgo de florecer que las plantas con restricciones hídricas.

A diferencia del resto de climas, en condiciones futuras de cambio climático se manifiestan importantes diferencias significativas entre plantas con régimen de riego y

plantas sometidas en sequía ($p < 0.0001$), viéndose fuertemente afectadas en ambos casos, sobre todo, aquellas con WR que en ningún caso desarrollaron inflorescencias (**ver figura 29**). En cuanto a la probabilidad de floración, no existe un efecto significativo en estas condiciones climáticas ($p = 0.997$), mostrando que las plantas en WW tienen 6.99×10^8 veces más riesgo de florecer que las plantas bajo estrés hídrico. La no floración por parte de las plantas en tratamiento de sequía y la gran tardanza en la floración para aquellas plantas que crecieron con disponibilidad de agua (el tiempo promedio es de 105.2 días) sugieren que *B. distachyon* es un candidato a la extinción.

En condiciones de temperatura elevada pero concentraciones de CO_2 actuales, también hay grandes diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.0001$), aunque en menor rango que las existentes para cambio climático. De igual forma, se observa que existe un fuerte efecto de la temperatura sobre *B. distachyon* que provoca un importante retraso en su floración, acentuándose esto cuando existe déficit hídrico (**Figura 29**). Por lo tanto, para las plantas que crecieron con régimen hídrico, el periodo de tiempo medio desde la germinación hasta la floración es de 129.2 días, mientras que, en el caso de las plantas en WR, se produce incluso un mayor retraso (137.2 días de media) (**Tabla 6**). Es de especial interés destacar que, para esta especie en concreto y para estas condiciones atmosféricas, cambia el comportamiento de las plantas pues ocurre una temprana floración en WW frente a WR. Ante tales circunstancias, las plantas en tratamiento de riego presentan 3.13 veces más riesgo de florecer que las plantas en sequía.

Para condiciones de CO_2 elevado pero temperatura actual, se aprecia un retraso significativo en la floración de *B. distachyon* en ambos tratamientos, aunque no resulta tan marcado como ocurre en condiciones de temperatura elevada y CO_2 actual. Al mismo tiempo, vuelven a existir diferencias significativas entre WW y WR ($p = 0.00139$) que implican periodos de floración distintos. En el caso de las plantas con restricciones hídricas, la floración ocurre antes (76.8 días promedio) que en las plantas cuyo crecimiento se rigió por un tratamiento de riego (116.8 días de media). No obstante, se alejan mucho del tiempo de floración que tiene lugar en el clima actual (**Tabla 6**). De hecho, en estas condiciones de CO_2 elevado pero temperatura actual, la tendencia de floración se invierte debido, probablemente, al efecto compensatorio del CO_2 que incrementa el rendimiento de las plantas en WR y favorece que tengan una mayor probabilidad de floración que las plantas en WW (**ver figura 29**). De esta manera, las plantas con régimen de riego normal tienen 0.16 veces menos riesgo de florecer que las plantas sujetas a restricciones de agua.

En el caso la especie *B. hybridum*, para el clima actual, los tiempos de floración presentaron diferencias significativas, aunque tenues, entre los individuos con régimen de riego y las plantas sometidas a sequía, ($p=0,029$) (**Figura 29**). Al no tener genes de vernalización, no requieren de frío para generar las primeras inflorescencias respondiendo a estas condiciones con tiempos de floración más adelantados que los de *B. distachyon* presenta para este mismo clima. De acuerdo con esto, el tiempo de floración medio para individuos con régimen de riego es de 47.9 días mientras que de 37.28 días para las plantas sometidas a sequía (**Tabla 6**). Por otra parte, el efecto significativo en la probabilidad de floración indica que los individuos que han crecido con disponibilidad de agua poseen 1.35 veces mayor riesgo de floración que las plantas con régimen de sequía.

En condiciones de cambio climático, existen también diferencias significativas entre WW y WR para *B. hybridum*, mostrando un mayor retraso en el tiempo de floración en las plantas con tratamiento de riego (70.7 días de media) (**ver Tabla 6 y figura 29**). En cambio, las plantas con restricciones hídricas durante su crecimiento, continuaron con la misma tendencia de floración que en condiciones atmosféricas actuales (37.5 días de media) (**Tabla 6**). Sin embargo, la magnitud de la probabilidad de floración fue significativa para WW, señalando que las plantas con un régimen de agua tienen 5.16 veces más riesgo de florecer a lo largo de su ciclo de vida que las plantas sometidas a sequía.

Para las condiciones de temperatura elevada pero CO_2 actual, se repite la misma situación que en *B. distachyon* puesto que, tanto las plantas de *B. hybridum* en tratamiento de sequía como con disponibilidad de agua, presentan un importante y fuerte retraso significativo en el tiempo de floración (**Figura 29**). Este comportamiento es indicativo de que, el incremento térmico, también afecta directamente al momento de floración de la especie *B. hybridum*. Por consiguiente, el periodo de tiempo medio entre la germinación e inicio de la floración es de 131 días para plantas que crecieron con restricciones de agua y 136.8 días para plantas regadas (**Tabla 6**). Por otro lado, al existir un efecto significativo en la probabilidad de floración de tratamiento de riego, se establece que las plantas en WW tienen 2.45 veces más riesgo de florecer a lo largo de su ciclo de vida que las que están sometidas a estrés hídrico.

En condiciones de CO_2 elevado pero temperatura actual, existen también diferencias significativas entre tratamientos. Para las plantas con WR, la floración promedio tiene lugar a los 85.9 días desde el momento en que germinaron mientras que, en el caso de plantas cuyo crecimiento estuvo regido por el régimen de riego, se produce un gran retraso (101.8 días de media) (**Tabla 6**). Asimismo, se vuelve a invertir la tendencia entre plantas crecidas

con restricciones de agua y con riego normal por la acción compensatoria del CO₂ que favorece en mayor medida a los individuos en WR (**Figura 29**). De este modo, y existiendo un efecto significativo en la probabilidad de floración, las plantas que disponen de agua tienen 0.48 veces menos riesgo de florecer en cualquier tiempo que aquellas con restricciones de agua.

Por último, los tiempos de floración para *B. stacei* y en clima actual, presentan leves diferencias significativas entre plantas regadas (38 días de media tardan en florecer) y plantas sometidas a sequía (39.03 días de media) (**ver Tabla 6 y figura 29**), mostrando igualmente que las plantas en régimen tienen 1.92 veces más riesgo de florecer que las plantas con déficit de agua.

En cambio climático, *B. stacei*, es la que mejor se comporta de las tres especies, puesto que es la que menos tarda en florecer bajo estas condiciones climáticas. Además, aunque entre tratamientos también hay diferencias significativas, no se aleja mucho el tiempo de floración de las plantas con restricciones de agua (35.78 días de media) del de las plantas con régimen hídrico (41 días de media) (**ver Tabla 6 y figura 29**). Con respecto a la probabilidad de floración, la magnitud del efecto significativo que presenta el tratamiento de riego es mayor en este clima que en el actual, permitiendo asegurar que las plantas que régimen hídrico tienen 2.54 veces más riesgo de florecer que aquellas que lo hicieron en tratamiento de sequía.

Repetiendo el mismo comportamiento que *B. distachyon* y *B. hybridum*, en condiciones de temperatura elevada pero CO₂ actual, se aprecia de nuevo un retraso en la floración de *B. stacei*, tanto en WW como en WR, aunque la magnitud del efecto actúa en menor medida en *B. stacei* (**Tabla 6 y Figura 29**). Esto indica que la elevación de la temperatura es un factor que influye y afecta en gran medida a las tres especies aunque no de igual forma. Por otra parte, se distinguen también diferencias significativas entre tratamientos, en donde las plantas con régimen de agua, tardaron de media 87.5 días en florecer desde su germinación y, en el caso de las plantas en sequía, su floración tuvo lugar a los 94.5 días de media (**Tabla 6**). Hay que mencionar además que, como ocurre en *B. distachyon* para estas mismas condiciones de sólo temperatura elevada, los individuos con déficit hídrico manifestaron una floración posterior a las que tuvieron aquellos con disponibilidad de agua. Por último, en este clima es donde se presenta la mayor efecto significativa de la probabilidad de floración para WW, indicando esto que las plantas de *B. stacei* con dicho tratamiento tienen 3.19 veces más riesgo de florecer que las que estuvieron en WR durante el ciclo.

Finalmente, para concentraciones de CO₂ elevado pero temperatura actual, no existen diferencias significativas entre tratamientos ($p=0.37427$), indicando esto que los tiempos de floración para WW y WR es casi el mismo (**Figura 29**). En concreto, las plantas sin restricciones hídricas, florecieron a los 70.7 días de media y las plantas sometidas a sequía, tardaron 77.2 días de media. Por tanto, al no haber tampoco un efecto significativo en la probabilidad de floración ($p=0.467$), las plantas de ambos tratamientos tienen el mismo riesgo de florecer a lo largo del ciclo.

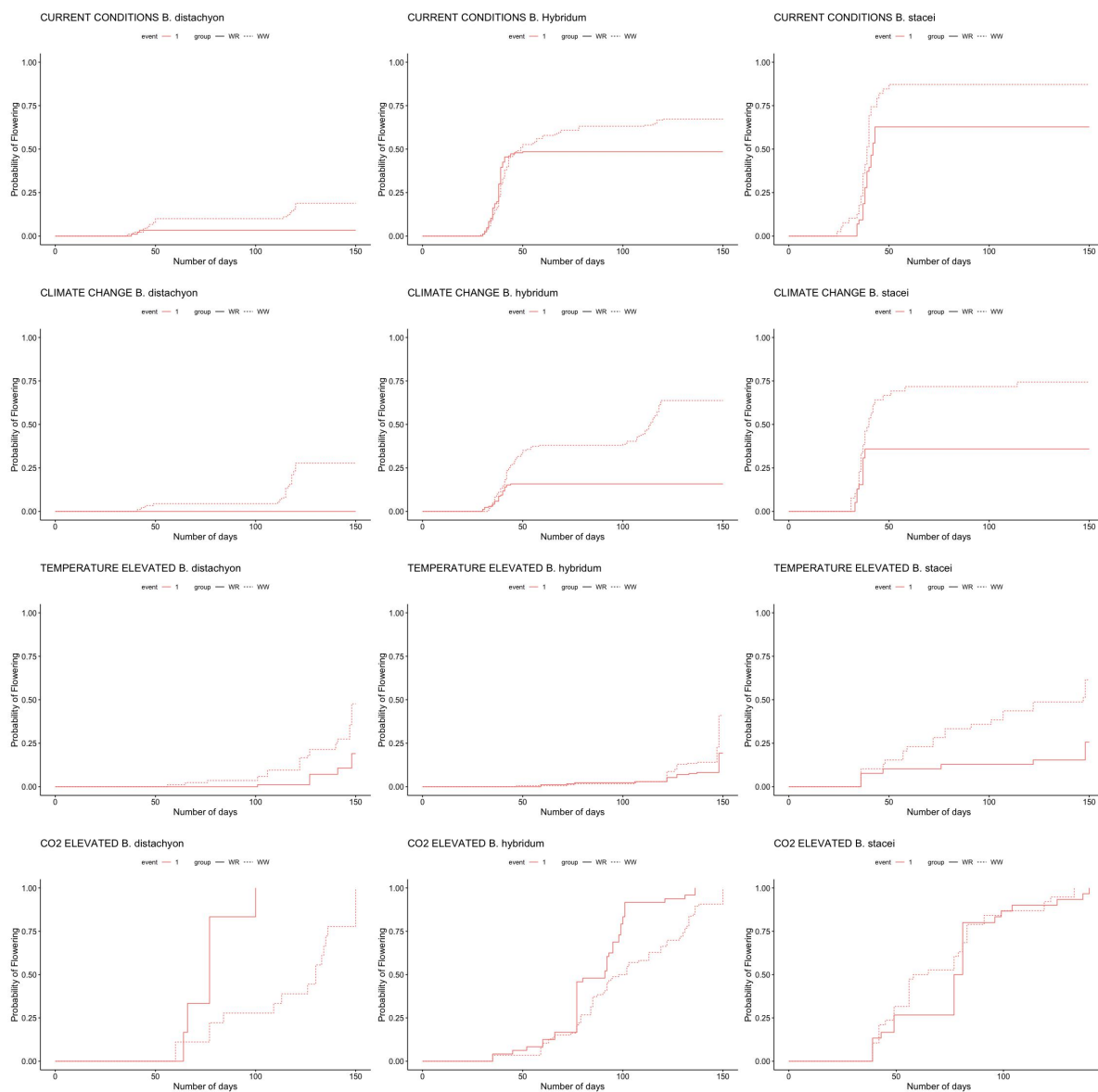


Figura 29: Tiempo de floración comparativa de las tres especies estudiadas para los cuatro climas experimentales y bajo tratamiento de riego (WW) y de sequía (WR).

5. Discusión

Los resultados obtenidos reflejan las diferentes respuestas ecofisiológicas que las especies anuales del género *Brachypodium* han tenido, y se pueden predecir que tendrán, en condiciones de cambio climático, tanto de manera aislada (temperatura elevada pero CO₂ actual y CO₂ elevado pero temperatura actual) como de manera conjunta (temperatura elevada y niveles de CO₂ elevados), así como sus comportamientos presentes con el clima actual. Ante el hecho de que la investigación se dividió en dos partes y con el fin de conocer y comparar sus comportamientos futuros, así como, entender la influencia que cada una de las variables tiene sobre el intercambio gaseoso, rasgos funcionales y floración, se aunaron los resultados del presente estudio (correspondientes a la investigación aislada del incremento térmico y el aumento de los niveles de CO₂) con los del anterior (resto de climas).

Ante esto, los resultados indican que la disponibilidad de agua en el suelo y el clima, de forma eminentemente independiente pero también mediante la interacción entre ellos, son los principales factores que influyeron en el intercambio gaseoso y en los rasgos funcionales de los individuos estudiados. No obstante, las respuestas que han tenido el complejo *Brachypodium* ante estos factores han sido variables. De esta forma, aunque el clima (concentraciones de CO₂ y temperatura) es un factor relevante al condicionar la tolerancia al estrés (WUE) y el contenido relativo de agua (RWC) de los genotipos, la disponibilidad de agua del suelo es quien define en mayor medida los rasgos de los individuos estudiados, especialmente los niveles de intercambio gaseoso – fotosíntesis y conductividad estomática – y el crecimiento foliar (SLA). Asimismo, los factores genéticos también han jugado un factor clave en el tiempo de floración de cada una de las especies, unido, nuevamente a la interacción entre clima y tratamiento.

5.1. Efectos del aumento térmico y/o niveles de CO₂ en el intercambio gaseoso

Como se ha definido anteriormente, la fotosíntesis se basa en la asimilación y fijación de carbono a través de una serie de procesos bioquímicos, con el fin de que las plantas se desarrollen y crezcan. Además es el principal mecanismo para fijar carbono en el planeta. En ella, el régimen hídrico es el principal factor que determinará la ganancia de carbono (**Figura 19**), pues la disponibilidad de agua influirá en la apertura de los estomas que son los encargados de llevar a cabo el intercambio gaseoso. En este caso, el tratamiento de riego ha incrementado la fijación de carbono en las tres especies al haber una mayor apertura estomática mientras que, las plantas bajo condiciones de sequía, han reducido sus tasas fotosintéticas debido a un mayor cierre de sus estomas para evitar la pérdida de agua.

Excepto en condiciones de CO₂ elevado y temperatura actual, esta tendencia se ha repetido en el resto de climas y para las tres especies.

Si bien las condiciones ambientales no influyen directamente sobre las plantas, sí que lo hacen a través de sus interacciones con el factor principal, de manera que la variación del clima sobre este rasgo ha estado ligado al tratamiento utilizado, como se desprende de los resultados de la descomposición de la varianza. Es por ello que, en condiciones de temperatura elevada y concentraciones de CO₂ actual, se observa una disminución de la fotosíntesis en plantas con restricciones de agua frente a las bien regadas, como consecuencia de un mayor cierre estomático que supone menor intercambio gaseoso y en respuesta al aumento de las temperaturas, en donde *B. stacei* mostró ser el que menor asimilación de carbono.

Por otra parte, en condiciones de CO₂ elevado y temperatura actual, las plantas con restricciones hídricas compensaron la falta de agua a través del incremento de CO₂ y obtuvieron las máximas fijaciones de carbono en estas condiciones. Este comportamiento se repitió en las tres especies, difiriendo la magnitud del efecto. En el caso de *B. distachyon*, obtuvo tasas fotosintéticas incluso superiores que las que tiene en condiciones de riego y clima actual. A su vez, en *B. stacei* a penas muestra diferencias entre tratamientos mientras que sí las hubo en *B. distachyon* y *B. hybridum*. De igual manera, las tres anuales, muestran mayores ganancias de carbono en sequía que cuando no hay limitación de agua. Es posible que la explicación de esto se deba a que el CO₂ tiene un efecto fertilizante en las plantas, de manera que, al incrementar sus concentraciones, aumenta también la fotosíntesis. Aun así, estos resultados no podrían definirse como reales, ya que en el cambio climático supone un incremento conjunto de las concentraciones de CO₂ y temperatura, aunque esta última no será homogénea a escala global.

Las diferentes tasas fotosintéticas obtenidas en el clima actual y en condiciones futuras pueden explicarse por el efecto aditivo del aumento del CO₂ y de las temperaturas que favorecieron la fijación de carbono de las plantas en sequía y en clima de cambio climático frente al clima actual. Asimismo, es en estas mismas condiciones actuales y ausencia de agua donde se obtuvieron las menores tasas fotosintéticas por tener un mayor cierre estomático. Todo lo contrario, ocurrió en régimen hídrico y clima futuro pues en las tres especies se maximizó la fotosíntesis debido a que, los niveles de CO₂ son muy superiores y, su efecto fertilizador unido a buenas condiciones de riego, provocó una apertura estomática superior. En este caso, *B. stacei* es la especie que mayor fijación de carbono tuvo en

régimen hídrico lo cual está asociado a las pre-adaptaciones de *B. stacei* ya que procede de ambientes más calurosos y áridos.

Al igual que sucede en la fotosíntesis, la conductividad estomática se encuentra regulada principalmente por la disponibilidad de agua, aunque no debe de olvidarse que ha existido una triple interacción (tratamiento x clima x especie) que indica que la magnitud de sus efectos influirá de diferente manera según la especie (**ver Tabla 5 y figura 20**). El estudio independiente del incremento térmico y de la elevación de los niveles de CO₂ ha manifestado que existe una mayor conductividad estomática cuando hay régimen hídrico y se produce una elevación de las temperaturas, pero se mantiene el CO₂ como el actual, pues el estrés por el calor es mitigado por la disponibilidad de agua y permite que las plantas abran más sus estomas. De las tres especies, *B. stacei* fue la que mayor apertura estomática tuvo dado su adaptación a los climas calurosos en los que habita, aunque también registró la mínima conductancia estomática cuando los individuos de la especie se expusieron a sequía, indicando esto que, aunque vive en zonas áridas, es más sensible si hay un aumento térmico y restricción hídrica. En cambio, *B. distachyon* fue el que menor conductividad estomática manifestó cuando hay régimen de riego debido a que, al encontrarse en zonas donde el clima es más suave, ha podido sufrir mayor estrés por calor al alejarse de su óptimo de temperatura. No obstante, el clima más húmedo en el que habita permite que, en condiciones de sequía, tenga una mayor apertura estomática que *B. stacei* y *B. hybridum*, ya que amortigua el estrés hídrico. El alotetraploide mostró valores intermedios pudiendo mostrar mejor adaptabilidad a un aumento térmico. En cambio, el aumento del CO₂ ha mostrado diferencias variadas según la especie. Las plantas abrieron más sus estomas cuando existió limitación de agua que sin restricciones hídricas debido al efecto fertilizante que tiene el CO₂. En este caso, *B. hybridum* y *B. distachyon* manifestaron mayor conductividad estomática en condiciones de sequía y enriquecimiento de CO₂ mientras que *B. stacei* tuvo la menor apertura de sus estomas sin importar el tratamiento.

De igual forma, tanto en el clima actual como en las condiciones futuras de cambio climático, la conductividad estomática ha sido superior en condiciones de riego que cuando las plantas se encontraron en estrés hídrico, sin importar en este caso la especie. Este hecho es debido a que los estomas han modificado su apertura en función de la limitación hídrica, con el fin de no perder el agua contenido en su sistema celular, indispensable para realizar correctamente todas sus funciones. Por ello, en condiciones de sequía, se ha producido un mayor cierre estomático que ha provocado un menor intercambio gaseoso. *B. stacei* es la especie que, ante restricciones hídricas ha mostrado la menor conductividad estomática en cambio climático, pero, sobre todo, en las condiciones actuales debido al

mayor cierre estomático anteriormente explicado, mientras que *B. distachyon* es el que mejor se comporta por las condiciones más favorables de su nicho ecológico. En cambio, en régimen hídrico y condiciones de cambio climático, *B. stacei* maximiza la apertura estomática y, con ello, aumenta su intercambio gaseoso mostrando efecto aditivo de los efectos climáticos, tanto en presencia como ausencia de agua. En el caso de *B. distachyon*, también se comporta de forma aditiva y aumenta su conductividad estomática con respecto al actual clima al ser la presencia agua un amortiguador del estrés por calor, aunque de las tres especies, es quien menos abrió los estomas. De nuevo, *B. hybridum* manifestó valores intermedios en la conductividad estomática.

En cuanto al WUE intrínseco, que relaciona la fotosíntesis y conductividad estomática, el clima tiene un efecto directo sobre cada especie. La elevación de las temperaturas conlleva a que exista un mayor estrés hídrico que obliga a las plantas a que gestionen de manera eficiente el agua del que disponen. Por lo tanto, las especies pueden desarrollar una serie de estrategias para poder tolerar o escapar de las posibles sequías previsibles en el futuro clima de cambio climático. Esto supone que las plantas deben ser más eficientes en el uso del agua para poder adaptarse a las nuevas condiciones ambientales. Cada una de las especies mostró las mayores eficiencias en el uso de agua en el clima actual pudiendo esto tener relación con las condiciones ambientales a las que están habituadas a crecer. Es decir, *B. distachyon*, que se encuentra en zonas de alta humedad y bajas temperaturas, ha mostrado mayor WUE en régimen hídrico que sin él. Por otro lado, los individuos de *B. stacei* fueron más eficientes cuando existió restricción hídrica, igual que ocurre en las zonas áridas a las que está habituado. En cambio, *B. hybridum* manifestó WUE intermedios y no hubo diferencias entre tratamientos, lo que sugiere que, con respecto a las especies parentales, el alotetraploide puede tener una capacidad adaptativa superior en las condiciones áridas en las que principalmente se encuentran sus poblaciones. Sin embargo, en cambio climático, *B. distachyon* es la especie que más eficaz tanto si hay presencia de agua como si no la hay.

Por otra parte, el aumento independiente de las temperaturas provoca en las tres especies una disminución drástica de WUE en comparación con la eficiencia hídrica que tienen en las condiciones actuales, a expensas del tratamiento al que se han visto sometidos sus respectivos individuos. Su explicación es que, el incremento de las temperaturas lleva asociada una mayor pérdida de agua, lo que lleva a las plantas a cerrar sus estomas para reducir el estrés y eludir daños internos, pero esto provoca que haya una menor conductividad estomática y, con ello, una menor fotosíntesis. Es por ello, que el grado de WUE que tendrán las plantas vendrá determinado por la conductividad estomática, es decir, cuando mayor sea el cierre estomático, mayor será el WUE, a no ser que existan

características adaptativas que les permitan ser más eficientes en el uso de agua sin ver afectada la apertura estomática. Es más, todo esto determinará también las estrategias que llevarán a cabo para tolerar el estrés hídrico. De esta manera, el efecto del incremento térmico (condiciones de temperatura elevada y niveles de CO₂ actuales) muestran que *B. hybridum* es, en condiciones de sequía, más eficiente en el uso de agua que *B. distachyon* y *B. hybridum*, indicando que su estrategia de escape de la sequía puede ser de carácter adaptativo, influenciado por su mayor presencia en zonas áridas y calurosas. Este hecho se ve reforzado en condiciones de CO₂ elevado y temperatura actual, donde la temperatura no tiene un fuerte impacto y los estomas pudieron estar más abiertos y donde *B. hybridum* volvió a mostrar un WUE mayor que sus progenitores, a expensas del tratamiento.

5.2. Influencia del incremento de las temperaturas y/o del CO₂ en los rasgos funcionales

El crecimiento foliar se encuentra afectado principalmente por la disponibilidad de agua que determina el grado de apertura estomática de las plantas y con ello, condiciona la fijación de carbono de cada una de las especies. Esto conlleva a que las plantas obtengan una cantidad determinada de biomasa que implicará un mayor o menor desarrollo y crecimiento de los individuos y de las hojas. Como se ve reflejado en la descomposición de la varianza (**ver figura 25**), el tratamiento vuelve a ser el principal factor que determinará el área foliar específica debido a que el estrés hídrico provoca un cierre estomático gradual con el que evitar una mayor pérdida de agua. A su vez, genera una redistribución de los recursos que pueden ser destinados a acelerar su ciclo de vida antes de la sequía sea más severa, lo que corresponde a una estrategia de escape de sequía. Asimismo, la varianza también es explicada, aunque en menor medida, por la interacción tratamiento x clima (**figura 25**) de tal modo que, exceptuando las condiciones enriquecidas de CO₂ elevado y temperatura actual, la superficie foliar es superior en plantas con régimen hídrico que sin él. De los resultados obtenidos de los modelos lineales mixtos generalizados se desprende que existe también una interacción significativa clima x especie (**ver Tabla 5**) que indica que se obtendrán SLA diferentes para las diferentes especies y climas.

Por otro lado, el efecto independiente del incremento térmico (observable en las condiciones de temperatura elevada y CO₂ actual) es mitigado cuando hay disponibilidad de agua, de manera que las plantas se encuentran más favorecidas y aumentan sus superficies foliares mientras que, cuando hay un prolongado secado del suelo, su tamaño mengua drásticamente como consecuencia de la redistribución de sus recursos, ya sea ampliando en profundidad sus sistemas radiculares para encontrar agua o porque están desarrollando una

estrategia de escape de sequía en el que priorizarán la descendencia al crecimiento vegetal. En estas condiciones, *B. hybridum* ha sido el que ha mostrado mayor SLA en ambos tratamientos y *B. stacei* los mínimos, volviendo a mostrarse que el diploide es más sensible al efecto aislado de las altas temperaturas ya que, los niveles de CO₂ en este ambiente no son lo suficientes como para poder amortiguar el efecto de la temperatura elevada. Sin embargo, si es las concentraciones de CO₂ se elevan, pero se mantiene la temperatura actual, *B. distachyon* es la especie que tiene mayor SLA tanto en sequía como sin restricciones de agua debido a que tienen una mayor apertura estomática, sobre todo en régimen de riego.

Comparando ahora el clima presente y futuro de cambio climático, se destaca que, la combinación del aumento térmico e incremento de las concentraciones de CO₂, influye positivamente en el crecimiento foliar de las tres especies debido a que existe una mayor fijación de carbono como consecuencia del aumento de la capacidad fotosintética. Dicho aumento de SLA será mayor cuando hay presencia de agua siendo *B. distachyon* el menos favorecido. En el caso de *B. stacei*, se maximiza su superficie foliar en condiciones futuras de siempre que haya disponibilidad de agua ya que, como se ha indicado anteriormente y puede verse en las **figuras 18 y 20**, tanto su conductividad estomática como su fotosíntesis se ven maximizadas en estas condiciones ambientales futuras, lo cual ha llevado a asimilar más carbono. En cambio, el incremento de la aridez provoca que tenga un SLA ligeramente superiores a los actuales. A su vez, el alotetraploide tiene valores intermedios al de sus progenitores cuando hay disponibilidad de agua, pero, su adaptación a climas áridos, hace que tenga el mayor SLA en sequía.

Por último, el contenido relativo en agua se encontró principalmente afectado por el clima pues determinó el grado de apertura estomática de las plantas para evitar la pérdida de agua, aunque la varianza y los análisis GLMMs (**figura 27 y Tabla 5**) también señalan que la magnitud del efecto de las condiciones ambientales afectó de diferente manera según la especie y/o la disponibilidad de agua. A groso modo, el régimen hídrico mitiga el estrés asociado al aumento térmico, por lo que los individuos se encontraron más favorecidos y no sufrieron un elevado estrés por calor, reduciendo las posibilidades de sufrir daños celulares. Ante esto, se entiende que las plantas con disponibilidad de agua pudieron tener una mejor resiliencia que las plantas que sufrieron estreses hídricos, cuyos posibles daños internos han podido ser mayores, provocando menos posibilidades de recuperación. Sin embargo, en este último caso, la aridez ejerce mayor presión cuando se suma al estrés por calor, reduciendo el RWC y afectando al estado celular. Ante esto, es posible que las plantas con limitación de agua hayan sintetizado más biomoléculas protectoras con las que recubrir sus

tejidos para enfrentarse a ambos tipos de estrés. Estos comportamientos se observan en las condiciones de temperatura elevada y CO₂ actual, donde las tres especies han obtenido el máximo RWC cuando ha habido disponibilidad de agua (sobresaliendo *B. hybridum* como la especie con mayor RWC) mientras que el estrés conjunto de la desecación del suelo y el incremento térmico les ha afectado considerablemente, sobre todo, en el caso de *B. stacei*.

En contraste, las condiciones enriquecidas en CO₂ pero que mantienen una temperatura actual, muestra que el RWC es máximo en condiciones de sequía, principalmente en *B. distachyon* y *B. hybridum*, debido a que no existe un estrés térmico. Sin embargo, *B. stacei* sufrió una elevada pérdida de agua en sus tejidos, indicando de nuevo que, aunque vive en zonas áridas y calurosas, es menos tolerante a la sequía. Por otra parte, la respuesta de las especies en condiciones de cambio climático indica de nuevo que la presencia de agua aumenta el contenido relativo de agua, reduciendo el daño celular y aumentando la tolerancia a la sequía. Aun así, el aumento conjunto de las temperaturas y del CO₂ afectan en mayor medida a *B. distachyon* al ser condiciones opuestas a las que se encuentra habituado en su ambiente natural. En cambio, *B. stacei* y *B. hybridum*, son mucho más tolerantes en estas condiciones debido a que tienen una mayor capacidad natural de resistir en condiciones cálidas.

5.3. Efectos de la elevación térmica y/o incremento del CO₂ en el periodo de floración

El tiempo de floración corresponde al periodo temporal entre el inicio de germinación de las semillas y el momento en que aparece la primera inflorescencia de la planta y constituye un rasgo adaptativo a las condiciones climáticas y de fotoperiodo. La variabilidad genética es la que determina el tiempo de floración, de forma que cada especie, y a su vez cada genotipo, tiene un momento determinado para iniciar su etapa reproductiva, dependiendo de si tienen genes de vernalización o no. Asimismo, la disponibilidad de agua y el clima también tienen cierto grado de influencia en que se produzca un adelanto o un retraso en la floración (**Figura 28**). Teniendo en cuenta esto, los resultados obtenidos hacen entender que, conforme más cerca del gradiente de aridez se establezca una especie, más temprana será su floración debido a posibles estrategias de escape de sequía y de temperatura.

Como ya se ha mencionado, la disponibilidad de agua es el factor más relevante para el desarrollo y crecimiento fisiológico de las plantas, así como, para sus principales procesos de intercambio gaseoso. Pero también influye en el momento en que se producirá la transición entre el periodo vegetativo y la época reproductiva. De forma generalizada, los

individuos del complejo *Brachypodium* suelen actuar como escapistas de la sequía como respuesta a un severo estrés hídrico, lo cual implica una floración temprana frente a los individuos con régimen de riego. De esta manera, las plantas gestionan sus recursos de forma que, antes de que se agoten, buscan asegurar su reproducción actual y no su supervivencia. Esta estrategia también puede venir sujeta por factores genéticos, que permiten a las plantas predecir sequías estivales que conlleven a inducir su floración con los mismos fines, es decir, priorizando la descendencia. A pesar de ello, las plantas con disponibilidad de agua suelen tener más probabilidades de floración a lo largo de su ciclo vital que las plantas sometidas a sequía debido a que existe una interacción entre el tratamiento hídrico y las condiciones climáticas. Esto se observa que en casi todos los climas, a excepción de las condiciones de CO₂ elevado y temperatura actual. Además, en condiciones futuras de cambio climático, es donde se maximiza dicha probabilidad.

Aún así, existen excepciones como es el caso de los individuos de *B. distachyon* y *B. stacei* en régimen hídrico y en condiciones de temperatura elevada, pero CO₂ actual (**Tabla 6**). En estos casos, estas plantas han mostrado un mayor estrés hídrico por las altas temperaturas que los individuos de las mismas especies que, durante su desarrollo y crecimiento, se adaptaron a las condiciones de sequía, de forma que, para atenuar dicho estrés y evitar posibles sequías terminales, actuaron como escapistas de sequía e indujeron su floración con anterioridad. Por otro lado, en condiciones de CO₂ elevado y temperatura actual, los individuos de *B. stacei* también mostraron el mismo comportamiento (plantas en WW florecieron antes que las plantas en WR) lo cual puede venir definido porque el CO₂ mejora aún más el rendimiento de las plantas con disponibilidad de agua.

Respecto a esto, en el clima actual se observa que la especie *B. distachyon* es la que más tarda en florecer a expensas del tratamiento debido a que esta especie tiene genes de vernalización o, dicho de otro modo, necesita de un periodo de frío para desarrollar la floración. En cambio, *B. hybridum* y *B. stacei* carecen de ellos, por lo que sus floraciones estarán más sujetas a las estrategias de tolerancia hídrica que tomen.

A su vez, la elevación de las temperaturas tiene un efecto negativo directo sobre la floración que puede causar diversas respuestas según su persistencia y magnitud, provocando, principalmente, un fuerte retraso en el momento de la floración que es constante para todas las especies. Como consecuencia, se produce una reducción del rendimiento vegetal futuro en todas las anuales, así como, compromete a los diversos genotipos que requieran de vernalización para poder florecer. Esto fue observable durante el experimento cuyas condiciones se basaron en una temperatura elevada y niveles de CO₂

actuales, en donde los diferentes genotipos desarrollaron pocas inflorescencias y, a su vez, pocas espiguillas como respuesta al estrés por calor. Esto derivó en una reducida producción de semillas maduras, mostrando que la temperatura afecta también fuertemente sobre la cantidad de recursos que las plantas destinarán a los embriones. Asimismo, podría incluso entenderse que el aumento de las temperaturas puede provocar esterilidad en las plantas, siendo esto otra de las posibles causas de los reducidos niveles de inflorescencias desarrolladas.

En condiciones de CO₂ elevado y temperatura actual se observa una inversión de la tendencia que ha tenido lugar en el resto de climas (plantas con riego tienen más probabilidades de florecer que las sometidas a estrés hídrico), que muy posiblemente sea debido al factor de fertilización que tiene el CO₂. Es decir, al haber un enriquecimiento de CO₂, favorece en gran medida a la fotosíntesis y, con ello, que las plantas tengan muy buen rendimiento, incluso en condiciones de sequía. Esto fue observable durante el experimento donde el CO₂ se incrementó hasta alcanzar concentraciones futuras mientras que la temperatura se asemejó a la actual. En estas condiciones climáticas, el desarrollo vegetal y crecimiento de los individuos fue abundante y acelerado, mostrando el carácter fertilizador que proporciona el CO₂. De igual forma, no sólo la floración se vio adelantada con respecto a las condiciones de temperatura elevada y CO₂ actual, sino que también se tradujo en el desarrollo de un mayor número de inflorescencias, y por ende de espiguillas, que resultaron en una elevada producción de semillas viables (con embrión bien formado).

De manera análoga, en las condiciones futuras de cambio climático, el aumento de las concentraciones de CO₂ amortiguará, relativamente, el efecto negativo que tiene la temperatura elevada sobre las plantas dado el efecto compensatorio que posee el CO₂. De esta forma, la especie que mejor se comporta en todas las condiciones climáticas estudiadas, y especialmente en un clima futuro de cambio climático, es *B. stacei* pues, de las tres especies, es la que tiene la floración más temprana y la que más se asemeja a la floración en condiciones actuales (se produce sólo un leve retraso de 3 días para las plantas con régimen hídrico y de 4 días para las sometidas a sequía (**ver Tabla 6**)). Esto puede deberse a que, de forma natural, la especie se encuentra adaptada a climas áridos y secos. Por lo tanto, su adaptación a altas temperaturas y a la aridez puede considerarse una ventaja sobre las otras dos especies anuales, traduciéndose esto en que perpetuará la especie en el futuro aun en condiciones adversas de temperatura elevada y niveles de CO₂ elevados.

En contraposición, *B. distachyon* es la especie donde se produce un mayor retraso en el momento de floración, a expensas del tratamiento y el clima. Este retraso es más acusado en condiciones de temperatura elevada y CO₂ actual, sobre todo, con escasez de agua, mostrando que, de las tres anuales, es a la que más le afecta las altas temperaturas ya que requieren de vernalización para iniciar la etapa reproductiva, lo cual, condiciona aún más la supervivencia de la especie a corto y medio plazo. Además, se observa que en futuras condiciones de cambio climático, no existió floración en los individuos con ausencia de agua durante su crecimiento, retrasándose en las que sí dispusieron de agua (**ver Tabla 6**). Teniendo en cuenta esto y que requieren de un periodo de frío para estimular su floración, lo cual viene imposibilitado por el aumento térmico, *B. distachyon* es un claro candidato a la extinción futura en condiciones de CO₂ elevado y temperatura elevada.

Por otro lado, el alotetraploide *B. hybridum* se halla en un estado intermedio entre sus progenitores. Comparte con *B. stacei* la inexistencia de genes de vernalización, además de que gran parte de sus poblaciones habitan en zonas áridas y secas, junto a *B. stacei*, por lo que, ante el aumento de las temperaturas, la especie puede tener una mayor capacidad de adaptación a las condiciones futuras de cambio climático. No obstante, también existen genotipos de *B. hybridum* que se hallan superpuestos a las poblaciones de *B. distachyon* (en climas húmedos y bajas temperaturas), a los cuales, puede que les cueste más aclimatarse a las nuevas condiciones ambientales, derivando en una disminución de sus poblaciones sin conllevar a extinción de estos genotipos.

Por tanto, podemos concluir que, los efectos futuros de temperaturas elevadas y concentraciones de CO₂ incrementados, favorecerían a *B. stacei* puesto que, al no tener genes de vernalización y estar más adaptadas a altas temperaturas y a la aridez, sus poblaciones florecerían antes que las de *B. hybridum* y, sobre todo, que las de *B. distachyon*. Ésta última sería la más perjudicada en estas nuevas condiciones climáticas ya que necesitan de un periodo de frío para activar la floración y, con ello, formar de semillas que les permitiera subsistir a largo plazo. Este nexo condiciona la perdurabilidad de la especie en el futuro, provocando incluso el agotamiento del banco de semillas por lo que, muy probablemente, la especie *B. distachyon* es candidata a extinguirse en un futuro. Además, el recurso agua también influye en el periodo de floración, provocando una floración temprana o tardía si, respectivamente, hay un prologando estrés hídrico o hay disponibilidad de agua.

5.4. Respuestas de las especies diploides y poliploides a la elevación del CO₂ y/o de la temperatura. Efecto de la poliploidía

Con el incremento de la aridez y la reducción del régimen de precipitaciones, se prevé que haya un mayor número de alotetraploides (Penner *et al.*, 2020). Su importancia reside en que, en comparación con los diploides, presentan una mayor capacidad adaptativa debido a la duplicación del genoma y el aumento de la heterocigosis (Manzaneda *et al.*, 2015). Esto indica que serán más resistentes y tolerantes a los diferentes tipos de estrés abiótico (Penner *et al.*, 2020). De acuerdo con esto, en el complejo *Brachypodium* se encuentra el alotetraploide *B. hybridum* que se originó a partir de cruces bidireccionales de sus progenitores diploides *B. stacei* y *B. distachyon* (López-Álvarez *et al.*, 2015). Y, a diferencia de los diploides, se encuentra más adaptada a condiciones áridas (Manzaneda *et al.*, 2015). Es por ello que se puede pensar que, además de los factores genéticos, también ha podido influir el origen geográfico de cada especie sobre los rasgos pues, cada una anual, se encuentra adaptada a unas condiciones ambientales diferentes que han podido aliviar o endurecer los efectos asociados al aumento independiente como conjunto de las concentraciones CO₂ y la temperatura.

En la mayoría de los rasgos estudiados, *B. hybridum* ha mostrado valores intermedios cuando ha crecido en condiciones ambientales actuales y ha habido régimen hídrico o escasez de agua. En cambio, los efectos independientes del incremento del CO₂ y del aumento aislado de la temperatura han mostrado que, en la mayoría de los rasgos, el alotetraploide ha manifestado mayores valores que los diploides, tendencia que ha sido especialmente observada cuando ha habido restricciones de sequía. El alotetraploide ha empleado en estas condiciones una estrategia de escape de sequía que conlleva un ciclo de vida más acelerado y una floración temprana que puede resultar beneficioso cuando hay una prolongada desecación del suelo pues busca prevalecer la descendencia antes que el crecimiento individual. Además, ha manifestado en todos los climas un RWC superior que los diploides, especialmente en condiciones de aridez. Esto puede suponer una ventaja adaptativa con respecto a sus progenitores diploides ya que, al perder menor cantidad de agua en sus tejidos aun existiendo presiones y diferentes tipos de estrés relacionados con el cambio climático, puede significar que ha adaptado su fisiología para soportar condiciones estresantes sin sufrir importantes daños celulares y en sus tejidos.

Por lo tanto, estos comportamientos muestran una adaptación adquirida por parte de *B. hybridum* que le beneficiará en el futuro clima de cambio climático, sobre todo en zonas donde aumente la aridez, mientras que los diploides presentan capacidades no adaptativas.

6. Conclusiones

El incremento aislado de las concentraciones de CO₂ tiene un efecto fertilizante sobre las plantas que les permite desarrollar una mayor capacidad para fijar carbono y aumentar su área foliar, así como, tener un crecimiento más rápido y un mayor rendimiento productivo (mayor producción de semillas) mientras que el aumento independiente de las temperaturas tiene un efecto negativo sobre las especies al causar un mayor estrés hídrico y reducir el intercambio gaseoso, WUE y rasgos funcionales con respecto a las tendencias actuales, especialmente en condiciones de sequía. Además se produce una importante disminución en la productividad. A pesar de ello, las condiciones de cambio climático suponen un efecto aditivo de ambas variables climáticas que, junto a la disponibilidad de agua y el clima, tanto a nivel independiente como a través de su interacción, determinarán en gran medida las diferentes respuestas ecofisiológicas del complejo *Brachypodium*. Por otra parte, las floraciones se adelantarán cuando los individuos no dispongan de agua durante su crecimiento como respuesta a una estrategia para escapar a la sequía. Aun así, tendrán menos probabilidades de florecer que las plantas con régimen hídrico adecuado.

Con respecto a las anuales, *B. stacei* es la especie que mejor se comportará en condiciones de cambio climático, siempre que no haya restricciones de agua, pues maximizará la fijación de carbono, la conductividad estomática y sus rasgos funcionales, aunque será la menos eficiente en el uso del agua (su estrategia no lo necesita realmente). No obstante, tendrá una floración más temprana, lo que implica tener ciclos de vida más rápidos. Por ello, no tendrá problemas de supervivencia a corto y medio plazo. En el caso de *B. hybridum*, su supervivencia tampoco se verá amenazada y será la especie más tolerante a la sequía. Además, tendrá el mejor intercambio gaseoso y rasgos funcionales en condiciones de aridez, gracias a una mayor plasticidad fenotípica y capacidad adaptativa. En contraposición, *B. distachyon* ha presentado el mayor WUE en condiciones de sequía pero también será la especie más afectada por el cambio climático, pudiendo provocar su extinción en un futuro no muy lejano debido al requerimiento de frío para florecer y del gran retraso que sufre su periodo de floración con el aumento de las temperaturas.

7. Referencias

- Ainsworth, E.A y Rogers, A. (2007). The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant, Cell & Environment*, 30(3): 258-270.
- Bakker, E.G., Montgomery, B., Nguyen, T., Eide, K., Chang, J., Mockler, T.C., Liston, A., Seabloom, E.W. y Borer, E.T. (2009). Strong population structure characterizes weediness gene evolution in the invasive grass species *Brachypodium distachyon*. *Molecular Ecology*, 18(12): 2588-2601.
- Berdugo, M., Delgado-Baquerizo, M., Soliveres, S., Hernández-Clemente, R., Zhao, Y., Gaitán, J.J., Gross, N., Saiz, H., Maire, V., Lehman, A., Rillig, M.C, Solé, R.V., Maestre, F.T. (2020). Global ecosystem thresholds driven by aridity. *Science* 367(6479):787-790.
- Bertolini, E., Verelst, W., Stephen Horner, D., Gianfranceschi, L., Piccolo, V., Inzé, D., Pè, M.E. y Mica, E. (2013). Addressing the role of microRNAs in reprogramming leaf growth during drought stress in *Brachypodium distachyon*. *Molecular Plant*, 6(2): 423-443.
- *Brachypodium distachyon* (L.) P.Beauv. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2021-08-14.
- *Brachypodium* P.Beauv. in GBIF Secretariat (2021). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2021-08-14.
- Cañadilla, M. F. (2019). Aproximación experimental de simulación de cambio climático. Universidad de Jaén, Jaén.
- Catalán, P. y Olmstead, R.G. (2000). Phylogenetic reconstruction of the genus *Brachypodium* P. Beauv. (Poaceae) from combined sequences of chloroplastndhF gene and nuclear ITS. *Plant Systematics and Evolution*, 220, 1-19.

- Catalán, P., Müller, J., Hasterok, R., Jenkins, G., Mur, L.A.J., Langdon, T., Betekhtin, A., Siwinska, D., Pimentel, M. y López-Álvarez, D. (2012). Evolution and taxonomic split of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Annals of Botany*, 109(2): 385-405.
- Catalán, P., Chalhoub, B., Chochois, V., Garvin, D.F., Hasterok, R., Manzaneda, A.J., Mur, L.A.J., Pecchioni, N., Rasmussen, S.K., Vogel, J. P. y Voxeur, A. (2014). Update on the genomics and basic biology of *Brachypodium*: International *Brachypodium* Initiative (IBI). *Trends in Plant Science*, 19(7): 414-418.
- Catalán, P., López-Álvarez, D., Díaz-Pérez, A., Sancho, R. y López-Herránz, M.L. (2016). Phylogeny and evolution of the genus *Brachypodium*. In: Vogel, J. (eds) *Genetics and Genomics of Brachypodium. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*, vol 18. Springer, Cham, pp. 9-38.
- Crous, K.Y. (2019). Plant responses to climate warming: physiological adjustments and implications for plant functioning in a future, warmer world. *American Journal of Botany*, 106(8): 1049-1051.
- Des Marais, D.L. y Juenger, T.E. (2016) *Brachypodium* and the abiotic environment. In: Vogel, J. (eds) *Genetics and Genomics of Brachypodium. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*, vol 18. Springer, Cham, pp 291-311.
- Des Marais, D. L., Razzaque, S., Hernandez, K. M., Garvin y D. F., Juenger, T. E. (2016). Quantitative trait loci associated with natural diversity in water-use efficiency and response to soil drying in *Brachypodium distachyon*. *Plant Science*, 251: 2-11.
- Draper, J., Mur, L. A. J., Jenkins, G., Ghosh-Biswas, G. C., Bablak, P., Hasterok, R. y Routledge A.P.M. (2001). *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiology*, 127(4): 1539-1555.
- Garvin, D.F., Gu, Y-Q., Hasterok, R., Hazen, S.P., Jenkins, G., Mockler, T.C., Mur, L.A.J. y Vogel, J.P. (2008). Development of genetic and genomic research resources for *Brachypodium distachyon*, a new model system for grass crop research. *Crop Science*, 48(S1):S69-S84.

- González, L. y González-Vilar, M. (2001). Determination of Relative Water Content. In: Reigosa Roger M.J. (eds) *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Springer, Dordrecht, pp. 207 - 212.
- Gordon, S.P., Priest, H., Des Marais, D.L., Schackwitz, W., Figueroa, M., Martin, J., Bragg, J.N., Tyler, L., Lee, C.-R., Bryant, D., Wang, W., Messing, J., Manzaneda, A.J., Barry, K., Garvin, D.F., Budak, H., Tuna, M., Mitchell-Olds, T., Pfender, W.F., ... Vogel, J.P. (2014), Genome diversity in *Brachypodium distachyon*: deep sequencing of highly diverse inbred lines. *The Plant Journal*, 79(3): 361-374.
- Harsant, J., Pavlovic, L., Chiu, G., Sultmanis, S. y Sage, T.L. (2013). High temperature stress and its effect on pollen development and morphological components of harvest index in the C3 model grass *Brachypodium distachyon*. *Journal of Experimental Botany*, 64(10):2971-2983.
- Kellogg, E.A. (2001). Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiology*, 125(3): 1198-1205.
- Kirschbaum, M.U.F. (2004). Direct and indirect climate change effects on photosynthesis and transpiration. *Plant Biology*, 6(03), 242-253.
- Lawson, T. y Vialet-Chabrand, S. (2019). Speedy stomata, photosynthesis and plant water use efficiency. *New Phytologist*, 221(1): 93-98.
- López-Álvarez, D., López-Herranz, M.L., Betekhtin, A. y Catalán, P. (2012) A DNA barcoding method to discriminate between the model plant *Brachypodium distachyon* and its close relatives *B. stacei* and *B. hybridum* (Poaceae). *PLOS ONE*, 7(12): e51058.
- López-Álvarez, D., Manzaneda, A.J., Rey, P.J., Giraldo, P., Benavente, E., Allainguillaume, J., Mur, L., Caicedo, A.L., Hazen, S.P., Breiman, A., Ezrati, S. y Catalán, P. (2015). Environmental niche variation and evolutionary diversification of the *Brachypodium distachyon* grass complex species in their native circum-Mediterranean range. *American Journal of Botany*, 102(7): 1073-1088.
- Lobell, D.B. y Gourdji, S.M. (2012). The influence of climate change on global crop productivity. *Plant Physiology*, 160(4): 1686-1697.

- Lugojan, C. y Ciulca, S. (2011). Evaluation of relative water content in winter wheat. *JOURNAL of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 15(2), 173-177.
- Luo, N., Liu, J., Yu, X. y Jiang, Y. (2011). Natural variation of drought response in *Brachypodium distachyon*. *Physiologia Plantarum*, 141(1): 19-29.
- Manzaneda, A.J., Rey, P.J., Bastida, J.M., Weiss-Lehman, C., Raskin y E., Mitchell-Olds, T. (2012). Environmental aridity is associated with cytotype segregation and polyploidy occurrence in *Brachypodium distachyon* (Poaceae). *New Phytologist*, 193(3): 797-805.
- Manzaneda, A.J., Rey, P.J., Anderson, J.T., Raskin, E., Weiss-Lehman, C. y Mitchell-Olds, T. (2015). Natural variation, differentiation, and genetic trade-offs of ecophysiological traits in response to water limitation in *Brachypodium distachyon* and its descendent allotetraploid *B. hybridum* (Poaceae). *Evolution*, 69(10): 2689-2704.
- Medlyn, B.E., Duursma, R.A., Eamus, D., Ellsworth, D.S., Prentice, I.C., Barton, C.V.M., Crous, K.Y., De Angelis, P., Freeman, M., Wingate, L. (2011). Reconciling the optimal and empirical approaches to modelling stomatal conductance. *Global Change Biology*, 17(6): 2134-2144.
- Ozdemir, B.S., Hernández, P., Filiz, E. y Budak, H. (2008). *Brachypodium* genomics. *International Journal of Plant Genomics*, 2008:536104.
- Penner, S., Dror, B., Aviezer, I., Bar-Lev, Y., Salman-Minkov, A., Mandakova, T., Šmarda, P., Mayrose, I. y Sapir, Y. (2020). Phenology and polyploidy in annual *Brachypodium* species (Poaceae) along the aridity gradient in Israel. *Journal of Systematics and Evolution*, 58(2): 189-199.
- Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M.S., Cornwell, W.K., Craine, J.M., Gurvich, D.E., Urcelay, C., Veneklaas, E.J., Reich, P.B., Poorter, L., Wright, I.J., Ray, P., Enrico, L., Pausas, J.G., de Vos, A.C., ... Cornelissen, J.H.C. (2016). *Corrigendum to: New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. Australian Journal of Botany*, 64(8): 715-716.

- Quinn, G. P. y Keough, M. J. (2002). *Experimental Design and Data Analysis for Biologist*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Rey, P.J., Manzaneda, A.J. y Alcántara, J.M. (2017). The interplay between aridity and competition determines colonization ability, exclusion and ecological segregation in the heteroploid *Brachypodium distachyon* species complex. *New Phytologist*, 215(1): 85-96.
- Sancho, R., Cantalapiedra, C.P., López-Álvarez, D., Gordon, S.P., Vogel, J.P., Catalán, P. y Contreras-Moreira, B. (2018). Comparative plastome genomics and phylogenomics of *Brachypodium*: flowering time signatures, introgression and recombination in recently diverged ecotypes. *New Phytologist*, 218(4): 1631-1644.
- Scholthof, K-B.G., Irigoyen, S., Catalán, P. y Mandadi, K.K. (2018). *Brachypodium*: A monocot grass model system for plant biology. *The Plant Cell*, 30(8): 1673-1694.
- Schwartz, C.J., Doyle, M.R., Manzaneda, A.J., Rey, P.J., Mitchell-Olds, T. y Amasino, R.M. (2010). Natural variation of flowering time and vernalization responsiveness in *Brachypodium distachyon*. *BioEnergy Research*, 3(1): 38-46.
- Shiposha, V., Marques, I., López-Alvarez, D., Manzaneda, A.J., Hernández, P., Olonova, M., Catalán, P. (2020). Multiple founder events explain the genetic diversity and structure of the model allopolyploid grass *Brachypodium hybridum* in the Iberian Peninsula hotspot. *Annals of Botany*, 125(4): 625-638.
- Shukla, P. R., Skea, J., Calvo Buendia, E., Masson-Delmotte, V., Pörtner, H. O., Roberts, D. C., Zhai, P., Slade, R., Connors, S., van Diemen, R., Ferrat, M., Haughey, E., Luz, S., Neogi, S., Pathak, M., Petzold, J., Portugal Pereira, J., Vyas, P., Huntley, E., ... & Malley, J. (2019). IPCC, 2019: Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems.
- Vogel, J.P. (2016). The rise of *Brachypodium* as a model system. In: Vogel, J. (eds) *Genetics and Genomics of Brachypodium*. *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*, vol 18. Springer, Cham, pp. 1-7.

- Watt, M., Schneebeli, K., Dong, P., Wilson, I.W. (2009) The shoot and root growth of *Brachypodium* and its potential as a model for wheat and other cereal crops. *Functional Plant Biology*, 36(11):960-969.
- Wheeler, T. y von Braun, J. (2013). Climate change impacts on global food security. *Science*, 341(6145): 508-513.
- Wilson P., Streich, J. y Borevitz, J. (2016). Genomic diversity and climate adaptation in *Brachypodium*. In: Vogel J. (eds) *Genetics and Genomics of Brachypodium. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models*, vol 18. Springer, Cham, pp. 107-127.
- Ye, Z-P., Ling, Y., Yu, Q., Duan, H.L., Kang, H.J., Huang, G.M., Duan, S.H., Chen, X.M., Liu, Y.G. y Zhou, S.X. (2020). Quantifying light response of leaf-scale water-use efficiency and its interrelationships with photosynthesis and stomatal conductance in C3 and C4 species. *Frontiers in Plant Science*, 11:374.

8. Anexo I

