

Tesi Doctoral

**ELS FENOLS, ENTRE EL CARBONI I EL
NITROGEN**

**Resposta als increments de CO₂ atmosfèric i
interacció amb el cicle del nitrogen**

Eva Castells Caballé

Novembre 2001

CREAF - Unitat d'Ecologia
Departament de Biologia Animal, Vegetal i Ecologia
Facultat de Ciències
Universitat Autònoma de Barcelona



Departament de Biologia Animal,
Biologia Vegetal i Ecologia
Unitat d'Ecologia

ELS FENOLS, ENTRE EL CARBONI I EL NITROGEN

Resposta als increments de CO₂ atmosfèric i interacció amb el cicle del nitrogen

Memòria presentada per:

Eva Castells Caballé

per optar al grau de Doctor en Biologia

Amb el vist-i-plau del director de tesi:

Josep Peñuelas

Bellaterra, novembre del 2001

Al Francesc

i al Gil

AGRAÏMENTS

Si m'haguessin preguntat fa uns anys a què em dedicaria en un futur no hauria encertat mai que acabaria fent una tesi d'ecologia, potser perquè dedicar-me a la recerca no ha estat mai un objectiu vital si no més aviat un mitjà per fer del meu temps allò que més m'agrada: aprendre alguna cosa cada dia, no caure en la rutina, viatjar i conèixer l'incertesa, entendre el meu entorn, descobrir noves maneres d'entendre i afrontar-me als problemes, poder fer el què em ve de gust en cada moment sense pressions (que no em manin, vaja), poder tenir sovint un nou repte que m'inciti a millorar la tècnica de superar reptes, i sobretot pensar molt, moltíssim. Segurament podria haver satisfet aquest entusiasme que diuen que tinc fent feines molt diverses, però la casualitat m'ha portat fins aquí, i per tant, la feina que presento a les pàgines següents es mereixeria l'agraïment de tota aquella gent que m'ha fet despertar l'interès per alguna cosa - començant pels meus pares el mateix dia en què vaig néixer - i que al llarg dels anys han anat modelant la meva manera de pensar, de sentir i d'actuar. Crec que, dins la incertesa que tenia fa un anys sobre el meu futur, poder fer la tesi al CREAM ha estat una gran sort. Fer ciència m'ha donat una nova perspectiva del meu entorn i m'ha ofert l'oportunitat de conèixer una professió que em fa disfrutar dia a dia (alguns més i alguns menys, tot s'ha de dir) i em manté la inquietud d'aprendre. Al CREAM, a més, hi he trobat un grup d'amics amb qui he compartit moltes més coses que no pas les estrictament de feina. Però deixaré la vessant més filosòfica de l'agraïment per centrar-me en aquella gent que ha contribuït directament en l'elaboració de la tesi. Gràcies a Josep M^a Alcañiz, Silvia Artesero, Bernat Castells, Francesc Cebrià, Terry Chapin, Tom Clausen, Josep M^a Espelta, Marc Estiarte, Marta Mangirón, Jordi Martínez, Joan Masó, Marta Mastrantonio, Lola Oliver, Graça Oliveira, Oriol Ortiz, Josep Peñuelas, Joan Pino, Eduard Pla, Roger Puig, Tim Quintal, Javier Retana, Anselm Rodrigo, Catherine Roumet, Pere Rovira, Jacques Roy, Raymond Salvador, Isabel Serrasolses, David Valentine i Jordi Vayreda per ensenyar-me alguna tècnica, contestar o intentar contestar les meves preguntes, llegir i escoltar pacientment els meus plans de tesi o els meus resultats, donar-me un cop de mà al laboratori o al camp, intentar resoldre els meus dubtes en l'estadística o oferir-me algun consell que m'ha ajudat a orientar la tesi cap allò que finalment ha esdevingut. I ara que ja estic al final, voldria, a més, afegir un agraïment a Kiyokazu Agata, de la Universitat d'Okayama, per la seva gentilera en facilitar-me tot allò que m'ha calgut en la fase d'escriptura de la tesi, al Dave, de la Universitat d'Alaska a Fairbanks, que em va introduir en el món dels sòls i em va donar ànims per seguir treballant en un moment en què realment ho necessitava, i al Josep, que malgrat les nostres diferències - o les nostres igualtats - va confiar prou en la meva feina per finançar sense pensar-s'ho gaire els últims experiments que vaig fer al CREAM i m'ha donat un eficient cop de mà i suport en l'elaboració de la tesi durant aquest darrer any. Finalment, un agraïment que mai serà suficient pel Francesc, per fer junts aquest camí de recerca que no sempre ha estat senzill, per recolzar-me i animar-me constantment, i per portar-me a viure en aquest país tan tranquil, amable, exòtic i estrany on durant els últims nou mesos hem començat a compartir una nova aventura. I ara sí que acabo, pel petit Gil, que finalment sí que m'ha deixat acabar la tesi a temps i que tindrem la felicitat de conèixer pocs dies després d'escriure aquestes ratlles. Gràcies a tots!

Okayama, octubre del 2001

ÍNDEX

ELS FENOLS: ENTRE EL CARBONI I EL NITROGEN	1
INTRODUCCIÓ	3
1. EL METABOLISME SECUNDARI EN ECOLOGIA.....	5
2. ELS FENOLS	7
2.1. <i>Els fenols: gran diversitat d'estructures químiques amb propietats comunes</i>	7
2.2. <i>Estima de les concentracions de fenols</i>	8
2.3. <i>Diversitat en les concentracions de fenols</i>	8
2.4. <i>Per què existeix una variabilitat tan elevada en el tipus d'estructures i les concentracions de fenols?</i>	9
2.5. <i>Factors abiòtics que influencien la producció de fenols</i>	12
2.6. <i>Els fenols intervenen en múltiples interaccions ecològiques</i>	13
3. ELS FENOLS I L'INCREMENT DE CO ₂ ATMOSFÈRIC.....	17
3.1. <i>Previsions de l'increment de CO₂ atmosfèric i efectes en la fisiologia vegetal</i>	17
3.2. <i>Efecte de l'increment de CO₂ atmosfèric en les concentracions de fenols</i>	17
3.3. <i>Relacions entre la resposta dels fenols i la resposta de la biomassa, TNC i N</i>	18
3.4. <i>Variabilitat en la resposta de la vegetació a les concentracions elevades de CO₂</i>	19
4. ELS FENOLS I EL CICLE DEL NITROGEN	23
4.1. <i>El cicle del N</i>	23
4.2. <i>Efectes dels fenols en el cicle del N</i>	26
4.3. <i>Hipòtesis sobre la funció dels fenols al sòl</i>	29
OBJECTIUS I APROXIMACIONS EXPERIMENTALS.....	31
PART I: RESPOSTA DELS FENOLS A L'INCREMENT DE CO ₂ ATMOSFÈRIC	33
PART II: EFECTES DELS FENOLS EN EL CICLE DEL N.....	34
CONSIDERACIONS GENERALS.....	36
RESULTATS (I): RESPOSTA DELS FENOLS A L'INCREMENT DE CO₂ ATMOSFÈRIC ...	37
CAPÍTOL 1. INTRASPECIFIC VARIABILITY OF PHENOLIC CONCENTRATIONS AND THEIR RESPONSES	
TO ELEVATED CO ₂ IN TWO MEDITERRANEAN PERENNIAL GRASSES	39
1.1. <i>Abstract</i>	40
1.2. <i>Introduction</i>	41
1.3. <i>Materials and methods</i>	43
1.4. <i>Results</i>	45
1.5. <i>Discussion</i>	51

CAPÍTOL 2.EFFECTS OF COMMUNITY SPECIES DIVERSITY ON THE PHENOLIC COMPOUND RESPONSE	
TO ELEVATED [CO ₂] IN GREEN LEAVES AND LITTER OF 17 MEDITERRANEAN GRASSES.....	55
2.1. <i>Abstract</i>	56
2.2. <i>Introduction</i>	57
2.3. <i>Materials and methods</i>	59
2.4. <i>Results</i>	61
2.5. <i>Discussion</i>	68
CAPÍTOL 3.CARBON-BASED SECONDARY AND STRUCTURAL COMPOUNDS IN MEDITERRANEAN	
SHRUBS GROWING NEAR A NATURAL CO ₂ SPRING	73
3.1. <i>Abstract</i>	74
3.2. <i>Introduction</i>	75
3.3. <i>Materials and Methods</i>	77
3.4. <i>Results and Discussion</i>	79
RESULTATS (II): EFECTES DELS FENOLS EN EL CICLE DEL N.....	85
CAPÍTOL 4.INTERACTION BETWEEN THE PHENOLIC COMPOUND BEARING SPECIES <i>LEDUM</i>	
<i>PALUSTRE</i> AND SOIL N CYCLING IN A HARDWOOD FOREST	89
4.1. <i>Abstract</i>	90
4.2. <i>Introduction</i>	91
4.3. <i>Materials and methods</i>	93
4.4. <i>Results</i>	97
4.5. <i>Discussion</i>	101
CAPÍTOL 5.IS THERE A FEEDBACK BETWEEN SOIL N AVAILABILITY IN SILICEOUS AND	
CALCAREOUS SOILS AND <i>CISTUS ALBIDUS</i> LEAF CHEMICAL COMPOSITION?	107
5.1. <i>Abstract</i>	108
5.2. <i>Introduction</i>	109
5.3. <i>Materials and methods</i>	111
5.4. <i>Results</i>	117
5.5. <i>Discussion</i>	123
CAPÍTOL 6.ARE PHENOLIC COMPOUNDS RELEASED FROM <i>CISTUS ALBIDUS</i> RESPONSIBLE FOR	
CHANGES IN N CYCLING AT SILICEOUS AND CALCAREOUS SOILS?	135
6.1. <i>Abstract</i>	136
6.2. <i>Introduction</i>	137
6.3. <i>Materials and methods</i>	138
6.4. <i>Results</i>	143
6.5. <i>Discussion</i>	149

DISCUSSIÓ GENERAL I CONCLUSIONS.....	153
1. FONTS DE VARIABILITAT EN LA RESPOSTA DELS FENOLS A CONCENTRACIONS	
ELEVADES DE CO ₂	155
1.1. Variabilitat intraespecífica.....	155
1.2. Variabilitat química.....	157
1.3. Variabilitat metodològica.....	158
1.4. Variabilitat ambiental.....	162
1.5. Variabilitat temporal.....	162
2. RECONSIDERANT LA HIPÒTESI CARBON-NUTRIENT BALANCE PER PREDIR ELS	
CANVIS EN LES CONCENTRACIONS DE FENOLS.....	163
3. IMPLICACIONS A NIVELL D'ECOSISTEMA DELS CANVIS EN LES CONCENTRACIONS	
DE FENOLS I ALTRES QÜESTIONS OBERTES.....	165
4. CONCLUSIONS (PART I).....	167
5. EFECTES DELS FENOLS EN EL CICLE DEL N.....	169
5.1. La presència de capçada modifica el cicle del N.....	169
5.2. Els sòls silícics responen més a la presència de capçada que els sòls calcaris.....	172
5.3. L'addició de llixiviats modifica el cicle del N.....	172
5.4. Els fenols es llixivien de les fulles verdes i la fullaraca juntament amb altres compostos..	173
5.5. Efectes dels compostos no-fenòlics al cicle del N: increments de la immobilització.....	175
5.6. Efectes dels fenols al cicle del N: reduccions en la mineralització bruta.....	176
6. FUNCIONS DELS FENOLS ALLIBERATS AL SÒL.....	176
6.1. Els fenols i la interacció negativa entre plantes.....	176
6.2. Són els fenols importants en la regulació del cicle del N?.....	179
7. CONCLUSIONS (PART II).....	181
REFERÈNCIES	183

ELS FENOLS: ENTRE EL CARBONI I EL NITROGEN

Els fenols són metabòlits secundaris de base carbònica universals al regne vegetal. Són compostos d'un gran interès en els estudis d'ecologia ja que poden regular la intensitat de diverses interaccions ecològiques, com per exemple les relacions entre plantes i herbívors, entre plantes i plantes, i entre plantes i microorganismes del sòl. Les concentracions de fenols en planta estan determinades per factors abiòtics, especialment per la relació entre la disponibilitat de C i la disponibilitat de N per a la planta. Així doncs, una major disponibilitat de C, per exemple com a resultat d'un increment de les concentracions de CO₂ atmosfèric, podria determinar una estimulació de la síntesi de fenols. Aquests canvis, però, estaran sotmesos a la disponibilitat de N per a la planta, la qual serà variable depenent de les seves condicions de creixement i de la presència de competència. Els canvis en les concentracions de fenols en un escenari de canvi global podrien tenir conseqüències en els processos ecològics relacionats amb el metabolisme secundari.

En aquesta tesi ens hem interessat per dos aspectes de l'ecologia dels fenols. A la primera part (capítols del 1 al 3) hem estudiat les variacions de les concentracions de fenols en espècies mediterrànies sotmeses a concentracions elevades de CO₂ i crescudes en condicions properes a les naturals en competència per recursos. Amb aquests estudis volem esbrinar si un augment de CO₂ atmosfèric tendeix a incrementar les concentracions de fenols, tal com prediuen les hipòtesis fenotípiques d'assignació de recursos, quan les plantes estan sotmeses a una limitació per llum, aigua i nutrients, i si aquests canvis es mantenen quan les plantes han estat sotmeses a concentracions elevades de CO₂ durant llargs períodes de temps. A la segona part de la tesi (capítols del 4 al 6) ens hem interessat en el paper dels fenols com a reguladors del cicle del N en dos ecosistemes (boreal i mediterrani) caracteritzats per una limitació de N al sòl i una gran presència de plantes productores de fenols. L'objectiu d'aquests estudis ha estat determinar la importància dels fenols en el cicle del N.

INTRODUCCIÓ

1. EL METABOLISME SECUNDARI EN ECOLOGIA

Les plantes comparteixen amb tots els altres organismes un nombre de reaccions bioquímiques bàsiques implicades en la síntesi i degradació de metabòlits indispensables pel creixement i desenvolupament, tal com els àcid nucleics, les proteïnes, els carbohidrats o els lípids. Basat en aquest metabolisme primari, les plantes, a més, han evolucionat una segona corona de vies metabòliques que sintetitzen una extraordinària varietat de compostos secundaris. Originalment, el metabolisme secundari era considerat com un conjunt de vies no vitals per l'organisme al qual s'atribuïen funcions de detoxificació, degradació de productes o emmagatzematge (Haslam, 1986; Swain, 1977). Actualment se sap que, malgrat que no intervé directament en el creixement i desenvolupament de l'individu, el metabolisme secundari juga un paper important en la supervivència de les espècies ja que exerceix una funció reguladora de les interaccions entre els organismes i el seu medi biòtic (Rosenthal i Berenbaum, 1992) (Taula 1). Una de les funcions que tradicionalment s'han assignat al metabolisme secundari és la defensa química contra els herbívors (Ehrlich i Raven, 1964) a través dels seus efectes farmacològics i fisiològics que produeixen sobre els animals, tal com repel·lència, toxicitat, interferència amb la digestió, i reducció del creixement, supervivència i fecunditat (Futuyma i Keese, 1992) però més recentment també han estat relacionats amb la protecció contra la llum UV, i amb les interaccions entre plantes, plantes i patògens, i plantes i microorganismes (Waterman i Mole, 1994).

Metabolisme primari	Metabolisme secundari
<i>Creixement i desenvolupament de l'individu</i>	<i>Interacció de l'individu amb el seu entorn</i>
<ul style="list-style-type: none">• indispensable• uniforme• universal• conservatiu	<ul style="list-style-type: none">• dispensable per el creixement i desenvolupament; indispensable per a la supervivència de la població• singular• divers• adaptatiu

Taula 1. Metabolisme primari i metabolisme secundari: dos nivells funcionals amb característiques completament distintes (Hartmann, 1996).

La llibertat del metabolisme secundari per a dur a terme les modificacions estructurals sense perill vital per l'individu ha permès l'aparició d'una alta diversitat molecular i de retruc una variabilitat específica que reflexa les pressions selectives a què ha estat sotmesa la planta al llarg de la seva evolució (Hartmann, 1996). Fins a l'actualitat s'han aïllat més de 100.000 estructures químiques diferents en el regne vegetal, moltes de les quals són característiques

d'una o poques espècies. Aquesta alta variabilitat de compostos se sintetitzen a través de tres rutes metabòliques principals (via de l'acetat, via del mevalonat i via del shikimat) cada una originant un o pocs metabòlits clau a partir dels quals es formen la resta de derivats a través de simples transformacions enzimàtiques (Schoonhoven *et al.*, 1998). Donada l'alta variabilitat de compostos, és difícil fer una classificació segons la seva estructura molecular i normalment s'opta per fer una classificació derivada de les seves vies de síntesi (Harborne, 1988). Així doncs, les classes principals de compostos secundaris són 1) els compostos que contenen N, incloent els alcaloides, derivats d'alguns aminoàcids comuns tal com la lisina, la tirosina o el triptòfan, 2) els terpenoids i esteroids, derivats de l'àcid mevalònic o un precursor proper, i 3) els fenols, derivats de l'àcid shikímic.

2. ELS FENOLS

Els fenols constitueixen un grup de metabòlits especialment interessant en ecologia. En primer lloc, són compostos universals en el regne vegetal (Kubitzki i Gottlieb, 1984). En segon lloc, estan implicats en moltes relacions ecològiques, tal com les interaccions entre plantes de la mateixa espècie o altres espècies a través d'inhibir la germinació i el creixement vegetal (Gallet, 1994; Inderjit i Mallik, 1996a; Pellissier, 1993), interaccions entre plantes i herbívors (Schoonhoven *et al.*, 1998), i interaccions entre plantes i la flora del sòl mitjançant la modificació de la descomposició de la fullaraca i el cicle del nitrogen (Blum i Shafer, 1988). Aquesta varietat d'efectes els fa susceptibles d'exercir una important funció reguladora en els ecosistemes. En tercer lloc, i malgrat la seva gran diversitat estructural, comparteixen unes propietats químiques comunes que ens permeten quantificar-los a través d'uns mètodes relativament senzills (Waterman i Mole, 1994).

2.1. Els fenols: gran diversitat d'estructures químiques amb propietats comunes

El terme "fenol" s'utilitza per definir aquelles substàncies que tenen un o més grups hidroxils (OH) units a un anell benzènic. La reactivitat dels fenols prové principalment dels grups hidroxil, per exemple en la formació de ponts d'hidrogen amb altres molècules, però l'anell benzènic també intervé en algunes reaccions (Thomson, 1964). Els fenols presenten una alta diversitat d'estructures les quals es classifiquen segons el nombre de C presents al seu esquelet bàsic. Així doncs, trobem des de fenols simples amb un sol anell benzènic, com per exemple el catecol o l'àcid gàl·lic, fins complexos compostos d'alt pes molecular (500-20.000 daltons) formats per repeticions de monòmers de varis anells benzènics, els anomenats tanins condensats (Waterman i Mole, 1994). Poques classes de compostos fenòlics han atret més l'atenció dels ecòlegs que el grup dels tanins condensats, probablement per la seva presència en totes les classes de plantes vasculars, sovint en altes concentracions, i per la seva capacitat de formar enllaços amb proteïnes (Hagerman i Butler, 1991). Malgrat els fenols es troben universalment al regne vegetal la presència d'alguns tipus de fenols depèn del llinatge filogenètic de l'espècie. Per exemple, no es troben tanins hidrolitzables en les gimnospermes o grups evolutivament més antics (Kubitzki i Gottlieb, 1984).

2.2. Estima de les concentracions de fenols

Existeixen dues estratègies bàsiques a l'hora de quantificar les concentracions de fenols. Si l'objectiu de la recerca fa necessària una mesura acurada dels compostos específics presents a la planta, s'haurà de procedir a una purificació i quantificació dels fenols a través de mètodes com l'HPLC, TLC, GC, etc. En una gran part d'estudis ecològics, però, es realitza una mesura de les concentracions totals dels fenols sense tenir en compte de quin tipus de molècula provenen. La base conceptual de l'anàlisi dels fenols totals és la quantificació dels seus grups hidroxil, que com ja hem dit anteriorment són l'element bàsic de la seva reactivitat (Waterman i Mole, 1994). Encara que un mètode de quantificació dels fenols totals té desavantatges respecte l'anàlisi exhaustiu dels compostos, ja que barreja compostos d'estructura molt diversa, ens pot donar, per altra banda, un visió integrada de l'activitat dels fenols en les relacions ecològiques. Un dels mètodes més utilitzats, la reacció de Folin-Ciocalteu, es basa en una oxidació-reducció durant la qual el ió fenolat és oxidat en condicions alcalines mentre redueix un complex de tungstat i molibdè (Waterman i Mole, 1994). Com a resultat d'aquesta reacció s'obté una solució de color blau marí que pot ser mesurada en un espectrofotòmetre. El reactiu de Folin-Ciocalteu no és específic pels fenols ja que actua sobre tots els grups hidroxils independentment del tipus de compost i per tant és necessari realitzar un blanc on els fenols han estat prèviament absorbits per PVPP (polivinilpolipirrolidona) (Marigo, 1973).

2.3. Diversitat en les concentracions de fenols

La variabilitat en les concentracions de fenols és molt elevada a tots els nivells de complexitat, des dels òrgans de la planta fins el tipus d'ecosistemes. A nivell d'òrgan s'han vist variacions en les concentracions de fenols en llarg de l'eix longitudinal d'una fulla, amb concentracions més baixes en la zona propera al pecíol (Zucker, 1982). Alguns estudis també mostren concentracions més elevades als teixits externs de la planta, els quals constitueixen el primer contacte amb els herbívors, respecte els teixits interns (McKey, 1979). A nivell d'individu les concentracions de fenols són variables segons l'òrgan analitzat (Zangerl i Bazzaz, 1992), segons l'època de l'any (Feeny, 1970; Nilsson *et al.*, 1998; Salminen *et al.*, 2001) i l'estat fenològic de les fulles (Lees *et al.*, 1995; McKey, 1979), malgrat no s'han definit patrons homogenis per a totes les espècies. Estudis a nivell intraespecífic mostren que les concentracions de fenols i altres metabòlits secundaris tenen una forta base genètica. En la

revisió elaborada per Hamilton *et al.* (2001), l'heretabilitat dels fenols totals i els tanins, o sigui la proporció de la variació genotípica que és atribuïble als efectes genètics (i no ambientals), es situa entre un 48 % i un 97 %. En algunes espècies els fenols poden arribar a representar més d'un 60 % del pes sec total en fulla (Cates i Rhoades, 1977) mentre en altres espècies les concentracions són inapreciables. Les concentracions de fenols també varien a nivell intraespecífic segons les condicions de creixement de les plantes. Així doncs, els individus sotmesos a una major disponibilitat de carboni respecte la disponibilitat de nitrogen tendeixen a sintetitzar més fenols (Peñuelas i Estiarte, 1998). A nivell d'estratègia ecològica també trobem una alta variabilitat. Les espècies llenyoses presenten normalment concentracions més elevades de fenols d'alt pes molecular (tanins) que les espècies herbàcies (Coley *et al.*, 1985). Freqüentment la presència de fenols també s'associa a altres característiques com la presència de fulles de vida llarga, coriàcies, etc. Finalment, existeixen variacions a nivell d'ecosistema: en un estudi amb més de dues-centes espècies es van trobar concentracions de tanins 3 vegades més elevades en els boscos tropicals que no pas en boscos temperats (Coley i Barone, 1996).

2.4. Per què existeix una variabilitat tan elevada en el tipus d'estructures i les concentracions de fenols?

S'han elaborat diverses hipòtesis que intenten explicar les forces selectives que han determinat les grans diferències intraespecífiques i interespecífiques en la quantitat i tipus de metabòlits secundaris en vegetals. Les hipòtesis més influents fins a l'actualitat comprenen: *Resource availability* (Coley, 1988; Coley *et al.*, 1985), *Plant apparency* (Feeny, 1976; Rhoades i Cates, 1976), *Optimal defense* (McKey, 1974; Rhoades, 1979; Zangerl i Bazzaz, 1992), i *Coevolutionary hypotheses* (Ehrlich i Raven, 1964). La diferència essencial entre aquestes hipòtesis rau en la naturalesa de la variable que ha actuat com a factor de selecció sobre els metabòlits secundaris. Mentre que les hipòtesis *Resource availability* i *Plant apparency* donen més pes a factors intrínsecs de la planta com són el creixement i longevitat foliar, les hipòtesis *Optimal defense* i *Coevolutionary hypotheses* es decanten per un factor extrínsec, la influència de l'herbivorisme. Malgrat no és l'objectiu d'aquesta tesi fer una revisió exhaustiva d'aquestes hipòtesis, creiem que és necessari fer-ne un incís ja que han estat el marc conceptual en la major part dels estudis sobre el metabolisme secundari en ecologia.

2.4.1. *Resource availability hypothesis*

Coley *et al.* (1985) proposen que el factor determinant de la quantitat i del tipus de metabòlits secundaris en fulla ha estat la disponibilitat de recursos per la planta al llarg de la seva evolució. La presència de nutrients hauria condicionat les taxes de creixement vegetal - creixement ràpid en medis rics i creixement lent en medis amb pocs nutrients- i el creixement determinaria a la vegada la inversió òptima en metabòlits secundaris.

El tipus de metabòlits secundaris present en plantes està condicionat als costos directes que comporta la seva síntesi i manteniment. Es suggereix que en fulles de vida llarga predominaran les defenses metabòlicament inactives, amb elevades concentracions i grans despeses inicials de síntesi però baixes taxes de renovació, de manera que els costos seran amortitzables al llarg del temps. Les defenses amb aquestes característiques són anomenades “immòbils” (Coley *et al.*, 1985) o “quantitatives” (Feeny, 1976) i són bàsicament representades pels tanins. Per contra, les fulles de vida curta optaran per defenses “mòbils” o “qualitatives”, metabòlicament molt actives i amb baixes concentracions en constant renovació. Aquestes defenses, on Coley *et al.* (1985) hi inclouen els alcaloides, tenen un cost continu al llarg de la vida de la fulla i per tant no esdevenen avantatjoses en fulles de vida llarga. En un estudi amb 41 espècies d'arbres tropicals, Coley (1988) va observar una correlació positiva entre la longevitat foliar i la concentració de tanins, així com una relació inversa entre la taxa de creixement vegetal i les defenses mesurades a partir d'una combinació linial de fibres, tanins, duresa i pubescència de les fulles.

En la hipòtesi “Resource availability” també es planteja que els tipus de recursos disponibles a l'ambient podrien originar constrenyiments en la síntesi de determinats metabòlits secundaris. En ambients poc fèrtils, per exemple, els metabòlits basats en nitrogen (alcaloides) tindrien un alt cost relatiu comparat amb els metabòlits de base carbònica (fenols i terpens) i aquests últims estarien, per tant, favorablement seleccionats.

2.4.2. *Plant apparency hypothesis*

Un altre model d'evolució dels metabòlits secundaris va ser proposat per Feeny (1976) i Rhoades i Cates (1976). Aquesta hipòtesi reflexa l'eficàcia diferencial dels metabòlits “quantitatius” i “qualitatius” (segons la definició prèvia) en les seves funcions defensives contra els herbívors generalistes i especialistes. Segons la hipòtesi *Plant Apparency* el tipus de metabòlits secundaris està influenciat per “l'aparença” de la planta, definida per Feeny

(1976) com la predictibilitat espacial i temporal en la presència d'una planta. Les plantes "aparents" serien aquelles més fàcilment detectables pels herbívors especialistes i per això dedicarien necessàriament grans inversions en defenses quantitatives. Per contra, les plantes "no aparents" o amb distribucions efímeres i impredecibles s'escaparien més fàcilment dels herbívors especialistes i requeririen una inversió mínima en defenses qualitatives dedicada a fer front els herbívors generalistes no adaptats. Experiments amb 100 espècies vegetals diferents van mostrar que les plantes anuals i de fases inicials en la successió eren més comestibles per herbívors especialistes que les plantes d'estadis tardans, donant suport a la hipòtesi que les plantes pioneres o de la 'r' inverteixen menys en metabòlits secundaris que les plantes de la 'K' (Cates i Orians, 1975).

La hipòtesi *Plant Aparency* també relaciona, com la *Resource Availability*, l'estatus de la planta en la successió amb la seva inversió en metabòlits secundaris. Per la *Plant Aparency* les plantes van augmentant la seva aparença a mesura que la successió tendeix cap a estadis més avançats. Les espècies no aparents amb defenses qualitatives s'aniran substituint al llarg de la successió per espècies aparents amb defenses quantitatives.

2.4.3. *Optimal defense hypothesis*

La hipòtesi *Optimal Defense* (McKey, 1974; Rhoades, 1979; Zangerl i Bazzaz, 1992) tracta la distribució desigual de metabòlits secundaris en els diferents òrgans de la planta. Com que existeix una limitació en la síntesi de metabòlits secundaris, les substàncies deterrents pels herbívors haurien d'estar concentrades en aquells òrgans o teixits on la seva presència incrementés més l'eficàcia biològica de la planta (McKey, 1974). Segons aquesta hipòtesi, la distribució dels metabòlits secundaris en la planta es regeix per (i) el valor de l'òrgan a protegir o cost que suposa la pèrdua de l'òrgan per la planta, i (ii) la vulnerabilitat de la zona a atacar pels herbívors o probabilitat que un determinat òrgan sigui atacat amb èxit en absència de defenses químiques. D'acord amb aquests criteris de vàlua i vulnerabilitat, les defenses es situarien preferentment en teixits externs, fulles i tiges joves, flors, fruits i llavors, en estadis inicials del desenvolupament de la planta i en fases reproductives.

2.4.4. *Coevolutionary hypotheses*

La pol.linització de les flors pels insectes o les estratègies de metabòlits secundaris de les preses enfront els depredadors són exemples on dues o més espècies formen un sistema

d'influència recíproca que implica una millora de l'eficàcia biològica d'almenys una de les dues parts, segons es tracti de parasitisme, simbiosis, depredació o altres relacions tròfiques o colaterals. Aquestes relacions ecològiques són el resultat d'interaccions interespecífiques que reflexen l'especialització conjunta que han sofert les espècies al llarg del temps en el procés anomenat coevolució. Existeixen moltes teories que exposen els diversos processos d'evolució conjunta dels metabòlits secundaris i els herbívors sensibles a aquestes defenses, però van ser Ehrlich i Raven en l'article *Butterflies and plants: a study in coevolution* (1964) els primers a plasmar un exemple de coevolució. Segons aquests autors l'herbivorisme hauria condicionat la síntesi de metabòlits secundaris en planta i la presència d'aquests metabòlits determinarien a la vegada la supervivència i evolució dels herbívors. En un estadi posterior, la síntesis de defenses induiria a l'herbívor a fabricar sistemes de detoxificació específics, el qual impulsaria la planta a sintetitzar un altre tipus de metabòlits secundaris en un procés d'evolució continuada. Ehrlich i Raven (1964) van assumir que la selecció recíproca entre plantes i insectes va induir, per una banda, a la resistència i diversificació química en plantes, i per l'altra, a la especialització alimentària dels insectes. En l'actualitat existeixen innumerables dades que manifesten aquesta evolució recíproca (Dreyer *et al.*, 1985; Futuyma i Keese, 1992; Wink i Witte, 1985) i alguns autors fins i tot són de l'opinió que l'evolució dels repelents químics ha jugat un paper important en l'aparició i diversificació de noves famílies, ordres i subclasses en angiospemes (Cronquist, 1988).

2.5. Factors abiòtics que influencien la producció de fenols

Les concentracions de fenols a nivell genotípic poden variar segons les següents condicions de creixement de la planta:

2.5.1. Irradiància solar

El conjunt dels estudis realitzats fins a l'actualitat mostren un increment de les concentracions de fenols en plantes exposades a llum solar respecte plantes cultivades a l'ombra (veure revisió de Koricheva *et al.*, 1998), així com la existència de correlacions positives entre la intensitat de radiació i la quantitat de fenols (Bryant *et al.*, 1987; Mole *et al.*, 1988). La interpretació adaptativa d'aquesta tendència és que la producció de fenols podria reduir la

fotodestrucció dels teixits exposats mitjançant l'absorció de la llum UV (Waterman i Mole, 1994).

2.5.2. *Sequera*

La resposta dels fenols a la sequera mostra tendències molt variables, increments, manca de canvis i disminucions de les concentracions (Estiarte i Peñuelas, 1999). L'estudi conjunt d'aquestes respostes no mostra cap correlació entre l'estrès hídric i la quantitat de fenols (Koricheva *et al.*, 1998). Horner (1990) ha proposat que la variabilitat existent a la literatura podria explicar-se per la relació no-lineal entre la pressió del xilema i la síntesi de tanins. Per tant, la direcció i magnitud dels canvis en les concentracions de fenols poden dependre del grau de sequera.

2.5.3. *Disponibilitat de N, P i CO₂*

L'efecte de la fertilització ha estat un dels factors abiòtics més estudiats en la variació de les concentracions dels fenols en plantes. Les tendències generals mostren una reducció de les concentracions de fenols en plantes amb més disponibilitat de N, una manca de variació en relació a la fertilització de P i un increment en plantes sotmeses a increments de les concentracions de CO₂ (Koricheva *et al.*, 1998). Aquestes tendències s'han emmarcat dins la hipòtesi d'assignació de recursos "Carbon-Nutrient Balance" proposada per Bryant *et al.* (1983). Incidirem més sobre aquesta hipòtesi a l'apartat 3.2 ja que conforma un eix central en la primera part d'aquesta tesi.

2.6. Els fenols intervenen en múltiples interaccions ecològiques

Als fenols s'atribueixen múltiples funcions en les relacions ecològiques que haurien estat seleccionades en el curs de l'evolució ja que oferirien un augment de l'eficàcia biològica de les plantes que els produeixen. A continuació enumerem les més importants:

2.6.1. *Relacions planta-herbívor*

L'efecte dels fenols en les relacions entre plantes i herbívors ha estat un dels temes d'ecologia química més estudiats des de principis dels anys 60. Els fenols s'han relacionat amb la selecció d'aliment de moltes espècies animals, des de grans mamífers fins a insectes. De fet, les interaccions entre les plantes i els herbívors s'ha considerat tradicionalment com el principal factor de selecció al llarg de l'evolució, fins al punt que es considera que l'aparició del metabolisme secundari fa 400 milions d'anys està estretament vinculat amb la funció defensiva que van adquirir les primeres plantes de vida terrestre (Howe i Westley, 1988). La tendència general és que la presència de fenols, especialment tanins, fan reduir la ingesta d'aliment de molts herbívors com a conseqüència de les seves propietats tòxiques, repel·lents i d'inhibició de la digestió (Hagerman i Butler, 1991; Waterman i Mole, 1994). Les plantes segueixen tres estratègies en la síntesi de defenses: i) acumulacions constitutives, on els compostos defensius estan sempre presents al teixit diana, ii) producció de pro-toxines metabòlicament innòcues que són activades quan la planta és atacada pels herbívors, i iii) defenses induïdes que se sintetitzen en resposta a l'atac d'herbívors o microorganismes (Hartmann, 1996). A més, els fenols també participen en interaccions tritròfiques, ja que els compostos sintetitzats en planta poden ser segrestats per alguns insectes i ser posteriorment metabolitzats per utilitzar-los en defensa pròpia (Jones *et al.*, 1988).

2.6.2. *Pol.linització*

Els flavonoides, un dels grups de fenols més diversos i universals de la vegetació, participen en la coloració de les flors i per tant en les relacions entre les plantes i els seus pol.linitzadors (Harborne, 1988). Els flavonoides importants per la determinació del color de les flors absorbeixen la llum al rang del visible i de l'UV donant coloracions molt diverses que poden ser detectades per alguns insectes, com per exemple les abelles (Waterman i Mole, 1994).

2.6.3. *Al.lelopatia*

L'al.lelopatia és la interferència entre espècies vegetals (o microorganismes) a través de compostos químics (Rice, 1984). L'existència d'al.lelopatia en condicions naturals és un tema molt controvertit en ecologia ja que existeixen molts pocs estudis que demostrin que la

suposada interferència química entre espècies es deu a la presència de metabòlits secundaris i no pas a una simple competència per nutrients (veure Fitter i Hay, 1987). Existeixen nombrosos estudis sobre els efectes negatius dels fenols en la germinació (Ballester *et al.*, 1982; Chaves i Escudero, 1997; Pellissier, 1993), l'establiment de plàntules (Nilsson i Zackrisson, 1992) i el creixement vegetal (Gallet, 1994; Inderjit i Mallik, 1996a), però no se'n coneixen els mecanismes d'acció. Malgrat s'han fet intents per separar els efectes de la competència de recursos entre plantes amb els efectes al·lelopàtics (Nilsson, 1994) no està clar encara que els efectes negatius entre plantes estiguin causats per efectes directes dels metabòlits secundaris (Michelsen *et al.*, 1995; Nilsson, 1994; Schmidt *et al.*, 1997; Wardle i Nilsson, 1997).

2.6.4. *Descomposició de la fullaraca i disponibilitat de nutrients*

Els fenols poden ser alliberats al sòl a través de la lixiviació de les fulles verdes i la fullaraca, i exercir diversos canvis en la dinàmica dels nutrients (Kuiters, 1990). Un dels efectes tradicionalment més estudiats ha estat la inhibició de la descomposició, i per tant la disminució de la disponibilitat de N, mitjançant la formació de complexos entre els tanins i proteïnes procedents de la vegetació (Horner *et al.*, 1988). Tal com veurem més endavant (apartat 4.2) els fenols intervenen, a més, en múltiples transformacions del cicle del N, incloent canvis en l'activitat microbiana i la mineralització, immobilització i nitrificació del N. L'efecte dels fenols en el cicle del N constitueix la base dels estudis presentats a la segona part de la tesi.

3. ELS FENOLS I L'INCREMENT DE CO₂ ATMOSFÈRIC

3.1. Previsions de l'increment de CO₂ atmosfèric i efectes en la fisiologia vegetal

Les concentracions de CO₂ a l'atmosfera han incrementat un 30% aproximadament des del període pre-industrial com a conseqüència de l'activitat humana, principalment de la crema de combustibles fòssils (IPCC, 2001). Es preveu que les concentracions actuals al voltant de 360 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ es dupliquin a finals d'aquest segle. El CO₂ té la capacitat d'absorbir la radiació infraroja, i per tant contribueix a l'escalfament de la terra juntament amb altres gasos d'efecte hivernacle com l'òxid nítrós o el metà. Per altra banda, l'augment de CO₂ pot afectar directament la vegetació, per exemple augmentant la fotosíntesi i disminuint la conductància estomàtica. Els estudis dels efectes de les concentracions elevades de CO₂ en la fisiologia de les plantes mostren una tendència a l'increment de la biomassa, increment dels sucres no estructurals, disminució de les concentracions de nitrogen i increment dels metabòlits secundaris de base carbònica, entre ells els fenols (Farrar i Williams, 1991; Kimball, 1983; Koricheva *et al.*, 1998; McGuire *et al.*, 1995).

3.2. Efecte de l'increment de CO₂ atmosfèric en les concentracions de fenols

Les hipòtesis d'assignació de recursos com *Carbon-Nutrient Balance* (Bryant *et al.*, 1983) i *Growth Differentiation Balance* (Loomis, 1932; Herms i Mattson, 1992) s'han proposat per predir els efectes de la variació dels factors ambientals en la síntesi de fenols i altres compostos secundaris de base carbònica (Carbon-Based Secondary Compounds -CBSC-). Encara que les hipòtesis originals van ser pensades per predir la resposta de les plantes a la baixa disponibilitat de nutrients i de C, han estat aplicades als efectes de l'increment de CO₂ durant quasi 20 anys. Aquestes hipòtesis assumeixen que els canvis en les relacions entre la font i l'emportal de C, com a conseqüència de reduir la disponibilitat de nutrients o d'incrementar la disponibilitat de C, determinen variacions en la partició relativa del C cap a creixement, CBSC i carbohidrats no estructurals (Total Non-structural Carbohydrates -TNC-). L'increment de CO₂ estimularia més la fotosíntesi que el creixement com a conseqüència de la limitació d'altres recursos (Herms i Mattson, 1992; Peñuelas i Estiarte, 1998), i el conseqüent increment de la proporció de C/N disponible resultaria en una acumulació de

TNC, una disminució de la concentració de N i un increment de la síntesi de CBSC. S'han plantejat dues hipòtesis que expliquen l'increment de CBSC en aquestes condicions. Per una banda, Bass (1989) considera que l'excés de TNC no requereix per la síntesi de proteïnes és el principal factor que afecta l'increment de CBSC sota concentracions elevades de CO₂. Per altra banda, Lambers (1993) proposa que, quan la síntesi de proteïnes queda restringida per les altes proporcions de C/N, la consegüent baixa demanda de N determina l'estimulació de la síntesi de fenols ja que proteïnes i fenols comparteixen l'aminoàcid fenilalanina com a un precursor comú.

Tal com prediuen les hipòtesis d'assignació de recursos, les concentracions elevades de CO₂ atmosfèric produeixen un increment en les concentracions de fenols quan s'analitza la resposta conjunta de les espècies (Koricheva *et al.*, 1998), encara que en alguns estudis recollits a la literatura no es va trobar cap efecte o fins i tot es van trobar efectes negatius (Lavola *et al.*, 1998; Peñuelas i Estiarte, 1998). A més, la resposta dels fenols a l'increment de CO₂ sembla dependent del tipus de compostos. Per exemple, l'increment dels tanins condensats és més evident que l'increment d'altres grups de fenols, com per exemple els tanins hidrolitzables (Peñuelas i Estiarte, 1998).

3.3. Relacions entre la resposta dels fenols i la resposta de la biomassa, TNC i N

Els efectes de les concentracions elevades de CO₂ sobre el metabolisme secundari s'afegeixen a altres efectes fisiològics àmpliament documentats: increments de la biomassa (Kimball, 1983) i de les concentracions de TNC (Farrar i Williams, 1991; Koricheva *et al.*, 1998), i disminució de les concentracions de nitrogen (Koricheva *et al.*, 1998; McGuire *et al.*, 1995). La resposta de cada una d'aquestes variables no són independents entre si. Tal com hem vist, les hipòtesis d'assignació de recursos prediuen particions relatives del carboni entre el creixement i el metabolisme secundari (l'anomenat *carbon trade-off*). Aquesta partició, però, pot donar origen a relacions no-lineals entre els canvis en la biomassa i els canvis en les concentracions de CBSC sota diferents disponibilitats de recursos depenent de si s'esdevenen variacions en les taxes fotosintètiques (Herms i Mattson, 1992). En un ambient on la disponibilitat de recursos (llum, aigua o nutrients) és moderada o alta, les taxes de fotosíntesi són constants i properes al màxim. En aquestes condicions el *carbon trade-off* entre el creixement i el metabolisme secundari serà aparent a través d'una relació inversa entre la biomassa i els CBSC (l'anomenat *physiological trade-off*) (Castells, 1999; Herms i Mattson, 1992) (Fig.

1). Quan les taxes fotosintètiques són variables, però, el *carbon trade-off* pot no ser aparent. Per exemple, si l'assimilació de carboni incrementa degut a que la disponibilitat de nutrients passa de baixa a moderada, es poden trobar relacions positives entre la biomassa i els CBSC malgrat aquestes dues funcions competeixin per un recurs base comú (el carboni) (Herms i Mattson, 1992) (Fig. 1).

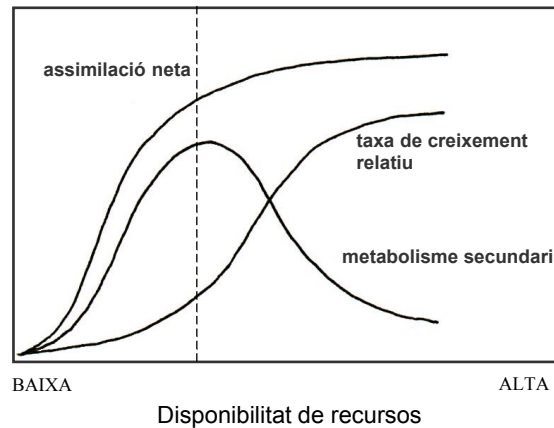


Figura 1. Variacions en l'assimilació neta de carboni, taxes de creixement i metabolisme secundari en resposta a la disponibilitat de recursos. Quan la disponibilitat de recursos és de baixa a moderada (a l'esquerra de la línia de punts) les taxes d'assimilació, creixement i metabolisme secundari (CBSC) estan positivament correlacionades. Quan la disponibilitat de recursos és de moderada a alta (a la dreta de la línia de punts) les taxes d'assimilació són constants i les taxes de creixement i el metabolisme secundari estan negativament correlacionades ja que la partició relativa entre la biomassa i els CBSC pot fer-se aparent (modificat de Herms i Mattson, 1992).

Per altra banda, segons les hipòtesis de Bass (1989) i Lambers (1993), esperem que l'increment de les concentracions de fenols a concentracions elevades de CO_2 vagi acompanyat per un increment de les concentracions de TNC i una disminució de les concentracions de N.

3.4. Variabilitat en la resposta de la vegetació a les concentracions elevades de CO_2

L'objectiu principal que persegueixen els estudis sobre els efectes directes sobre la vegetació de l'increment de CO_2 és poder realitzar prediccions sobre la resposta dels ecosistemes en un escenari de canvi global. La complexitat dels sistemes ecològics (des de la variabilitat genètica fins a les interaccions entre plantes passant per la variació de les respostes segons el temps d'exposició al CO_2) poden modificar la resposta 'base' de les plantes a l'increment de CO_2 estimada a partir d'espècies crescudes en condicions controlades i sense interaccions biòtiques on s'obvien els efectes de la selecció natural.

3.4.1. Variabilitat genètica

L'existència d'una variabilitat intraespecífica en resposta a les concentracions elevades de CO₂ podria determinar la selecció d'aquells genotips que han incrementat més la seva eficàcia biològica en les noves condicions ambientals (Thomas i Jasienski, 1996). La millora de l'eficàcia biològica podria ser resultat de tenir majors increments de la biomassa i per tant major capacitat de competir amb altres espècies vegetals, o bé per majors concentracions dels CBSC que reduiria la vulnerabilitat dels genotips enfront els herbívors. Si existeix una base genètica en la resposta als increments de les concentracions de CO₂, els increments previstos per les properes dècades podrien originar canvis en la composició genètica de les poblacions (Schmid *et al.*, 1996). La literatura mostra que el component genètic en la resposta al CO₂ és altament depenent de les espècies estudiades, dels caràcters analitzats en aquestes espècies i de les condicions de creixement (Lindroth *et al.*, 2001; Steinger *et al.*, 1997; Potvin i Tousignant, 1996; Wulff i Miller-Alexander, 1985). Els pocs estudis realitzats sobre la variació genotípica de les concentracions de CBSC en resposta al CO₂ mostren també resultats contradictoris. Així doncs, s'han trobat interaccions significatives entre la resposta dels genotips i l'increment de CO₂ en tres estudis (Goverde *et al.*, 1999; Lindroth *et al.*, 2001; Mansfield *et al.*, 1999) i manca d'interaccions en un tercer (Fajer *et al.*, 1992).

3.4.2. Variabilitat interespecífica

Les espècies tenen respostes molt variables a l'increment de CO₂ atmosfèric en plantes sotmeses a condicions similars de llum i nutrients (Peñuelas i Estiarte, 1998; Poorter *et al.*, 1996). La classificació de les espècies de característiques funcionals comunes en la resposta a l'increment de CO₂ és una fita important en els estudis de canvi global, ja que permet estructurar els resultats experimentals obtinguts i fer prediccions dels efectes en la vegetació (Díaz i Cabido, 1997; Grime, 1997). Un dels esculls principals alhora de determinar un nombre relatiu baix de grups funcionals universals ha estat el tipus de classificació. Originàriament, els grups funcionals havien estat definits pels biòlegs de poblacions a partir de patrons demogràfics (reproducció, mortalitat, dispersió de les llavors, etc.), però posteriorment va sorgir la necessitat d'introduir informació sobre la fisiologia i bioquímica de la planta, les quals determinen la capacitat de resposta als factors climàtics (Grime, 1997).

Llenyoses perennes < llenyoses caducifòlies < herbàcies perennes < herbàcies anuals
Arbre < arbre jove < plàntula
Estadis finals en la successió < estadis inicials en la successió
Embortal de fruit gran < embortal de fruit petit
Cap òrgan especial d'emmagatzematge < òrgans subterranis d'emmagatzematge
Fulla en posició horitzontal < fulla en posició vertical
Fulla ampla < fulla estreta
Metabolisme C4 < metabolisme C3
No fixadores de nitrogen < fixadores de nitrogen
Sense micorrizes < amb micorrizes

Taula 2. Característiques fisiològiques i ecològiques relacionades amb el grau de resposta de la biomassa a l'increment de CO₂, ordenades segons la seva magnitud (Körner, 1991).

La Taula 2 resumeix un conjunt de factors fisiològics i ecològics que van estar inicialment relacionats amb el grau de resposta de la biomassa a l'increment de CO₂ (Körner, 1991). El conjunt d'estudis realitzats fins a l'actualitat, però, posen en dubte que es puguin identificar grups funcionals en base a la seva resposta al CO₂, fins i tot per aquells casos més evidents, com les espècies C3 i C4, els llegums i no llegums, o les espècies perennes o lleguminoses (Körner, 2000). També s'han intentat fer classificacions en base a l'àrea específica foliar (Roumet i Roy, 1996) o la taxa de creixement (Poorter i Lambers, 1991; Poorter *et al.*, 1996). Poorter *et al.* (1996), per exemple, van trobar que les plantes de creixement ràpid responien més que les plantes de creixement lent. Per altra banda, en agrupar dades de diferents estudis on s'havia mesurat les taxes relatives de creixement (RGR) en espècies llenyoses i herbàcies, van trobar una relació positiva entre les RGR a CO₂ ambient i la seva resposta al CO₂. Tanmateix, la resposta de les espècies i els grups funcionals a les concentracions elevades de CO₂ s'ha mostrat depenent de la disponibilitat de recursos (Körner, 2000; Mooney *et al.*, 1991; Poorter *et al.*, 1996). Fins a l'actualitat no s'ha realitzat cap estudi que intenti agrupar les espècies en base a la resposta dels fenols a concentracions elevades de CO₂. La única tendència que s'ha trobat és una major resposta de les plantes llenyoses respecte les plantes herbàcies (Peñuelas i Estiarte, 1998).

3.4.3. Variabilitat a nivell de comunitat: impacte de la diversitat en la resposta al CO₂

Ja hem vist que intentar fer prediccions dels canvis en les comunitats vegetals sota condicions d'elevat CO₂ a partir de la resposta d'alguns genotips o d'algunes espècies pot presentar

diversos problemes donada l'altra variabilitat de respostes. Un altre factor que també cal tenir en compte són les interaccions entre espècies dins una comunitat. Un dels efectes previstos de les concentracions elevades de CO₂ és l'increment de la competència per recursos com a resultat d'increments en la biomassa (Bazzaz i McConnaughay, 1992). Aquest efecte s'espera que sigui més important en aquelles comunitats formades per espècies amb una resposta variable al CO₂ (Lüscher *et al.*, 1996). Per tal de preveure la resposta de les comunitats vegetals és necessari realitzar estudis que s'apropin a les condicions naturals, tan pel què fa als factors climàtics i edafològics com a les interaccions entre les diferents espècies vegetals. En els darrers anys han incrementat força els estudis que utilitzen metodologies més adequades per aconseguir condicions ambientals properes a les reals (Open Top Chambers, Free-Air Carbon Enrichment, Screen-Aided CO₂ Control, etc.) però l'estudi dels efectes de la diversitat vegetal en la resposta de les comunitats és encara un camp poc explorat (Leadley *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001; Niklaus *et al.*, 1998; Reich *et al.*, 2001), i només existeix un treball sobre els efectes de la diversitat en la resposta dels fenols en plantes cultivades a concentracions elevades de CO₂ (Hartley *et al.*, 2000).

3.4.4. Variabilitat temporal

L'increment en la fixació de carboni com a conseqüència de l'increment de CO₂ atmosfèric a curt termini (Bazzaz, 1990; Field *et al.*, 1992) podria veure's esmorteïda per diversos mecanismes de retroalimentació que actuarien sobre les taxes de fotosíntesi i el creixement a llarg plaç (Körner, 1996). L'acumulació de TNC en fulla pot acabar inhibint la fotosíntesi (Wang i Nobel, 1996). A nivell d'ecosistema, es postula que l'increment de C/N en fulla com a conseqüència de la disminució de N, retarda la descomposició de la matèria orgànica i disminueix la disponibilitat de N al sòl. Aquest procés té efectes negatius en la fotosíntesi (Körner, 1996). L'estimulació de la fotosíntesi com a resposta a un increment de CO₂ atmosfèric, doncs, no necessàriament ha de traduir-se a llarg termini en increments en la biomassa i la producció de la comunitat.

4. ELS FENOLS I EL CICLE DEL NITROGEN

4.1. El cicle del N

El cicle del N es pot dividir en un cicle extern i un cicle intern. El cicle extern inclou aquells processos que afegeixen o treuen N dels ecosistemes, tal com la fixació de N_2 , la deposició de N seca i humida, la fertilització amb N, la lixiviació de N, la denitrificació i la volatilització de l'amoni (Hart *et al.*, 1994). El cicle intern consisteix en aquells processos que converteixen el N d'una forma química a una altra, o transfereixen N entre els *pools* de l'ecosistema. Aquests processos inclouen: l'assimilació de N per part de les plantes, el retorn del N cap al sòl provinent de la fullaraca i el recanvi d'arrels, la mineralització del N (conversió de N orgànic a N mineral), la immobilització microbiana de N (adquisició de N inorgànic pels microorganismes), i la nitrificació (producció de nitrit i nitrat a partir d'amoni) (Fig. 2).

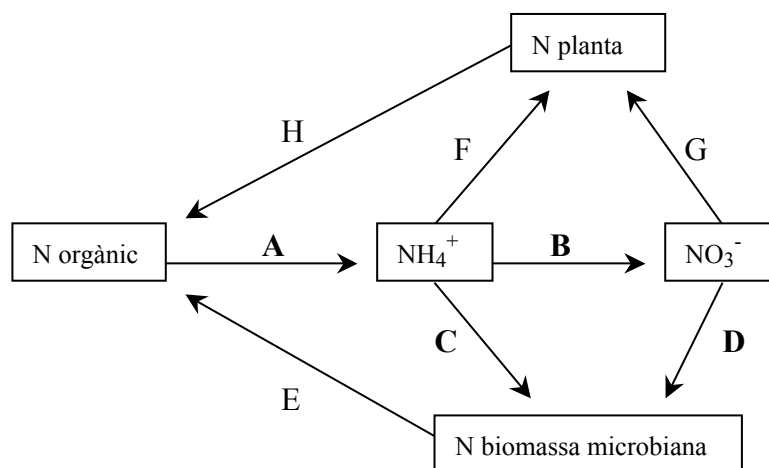


Figura 2. Cicle intern del N en ecosistemes terrestres (modificat a partir de Davidson *et al.*, 1992). Llegendra: A mineralització; B nitrificació; C immobilització de l'amoni; D immobilització del nitrat; E entrades detrítiques microbianes; F assimilació d'amoni; G assimilació de nitrat; H entrades detrítiques vegetals. Les taxes de transformació del N (A, B, C i D) es calculen en absència d'assimilació de N per part de les plantes i entrades detrítiques (E, F, G i H).

Com que el N és normalment l'element més limitant en els ecosistemes terrestres (Vitousek i Horwarth, 1991) les variacions en les taxes de mineralització, immobilització i nitrificació poden tenir un gran impacte en la disponibilitat de N per a les plantes i per tant en l'estructura dels ecosistemes.

4.1.1. Mesura de les taxes netes de transformació del N

La majoria de les estimes de mineralització i de nitrificació del N s'obtenen mitjançant la mesura de les taxes netes, o sigui de la quantitat de NH_4^+ o NO_3^- produït com a resultat del balanç entre la formació (mineralització o nitrificació) i la desaparició (immobilització) d'aquests compostos. En absència d'assimilació de N per part de les plantes, lixiviació o altres sortides de N com denitrificació, les taxes netes de mineralització i nitrificació es calculen segons la variació de la quantitat de N inorgànic en un interval de temps determinat (t) (Hart *et al.*, 1994):

$$\text{Mineralització neta N} = (\text{NH}_4^+\text{-N} + \text{NO}_3^-\text{-N})_{t+1} - (\text{NH}_4^+\text{-N} + \text{NO}_3^-\text{-N})_t$$

$$\text{Nitrificació neta N} = (\text{NO}_3^-\text{-N})_{t+1} - (\text{NO}_3^-\text{-N})_t$$

Un valor negatiu de mineralització neta indica que els processos d'immobilització són quantitativament més importants que els processos propis de mineralització.

La metodologia més utilitzada per estimar les taxes netes de transformació del N és la incubació de sòls, ja sigui en condicions controlades o *in situ*, on s'intenten reduir al màxim les pèrdues de N del sistema. L'elecció de fer incubacions al laboratori o al camp depèn principalment dels objectius de la recerca que es porta a terme. Per una banda, la realització d'incubacions al laboratori permet reduir la variabilitat del processos de transformació del N mitjançant unes condicions homogènies de temperatura i humitat, alhora que ens dóna informació sobre les taxes netes dels sòls. Mitjançant aquest procediment obtenim unes taxes potencials (dependents de les condicions ambientals escollides) que poden esdevenir informatives al comparar sòls de diferents característiques físico-químiques o amb presència de diferents substrats orgànics. Per altra banda, però, és inevitable recórrer a les incubacions *in situ* si es persegueix una estima de les taxes de mineralització reals en condicions de camp. Tal com es detalla posteriorment als materials i mètodes dels capítols 4, 5 i 6, nosaltres vam optar per incubar els sòls en condicions controlades durant un període de 28 dies. Aquesta durada de la incubació és la normalment recomanada ja que ens permet obtenir uns resultats a relatiu curt plaç però a la vegada les taxes de transformació de N dels sòls s'han recuperat de la pertorbació que suposa el processament de les mostres (Hart *et al.*, 1994).

4.1.2. Mesura de les taxes brutes de transformació del N

La informació obtinguda mitjançant la mesura de les taxes netes de transformació del N pot ser a vegades insuficient, com per exemple quan es volen estudiar les variacions de la mineralització bruta, nitrificació bruta o immobilització. Ens aquests casos cal recórrer a altres tècniques més complexes que fan ús dels isòtops estables ^{14}N i ^{15}N .

Una de les tècniques utilitzades és l'anomenada “ ^{15}N isotope dilution” (veure materials i mètodes dels capítols 4 i 6), on s'enriqueix amb ^{15}N el producte de la reacció que volem mesurar ($^{15}\text{NH}_4^+$ per la mineralització bruta i $^{15}\text{NO}_3^-$ per la nitrificació bruta) i es fa un seguiment de l'evolució de les proporcions $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ al llarg d'un període de temps determinat. El mètode es basa en la consideració que, mentre la producció de NH_4^+ (o NO_3^-) diluirà la presència del $^{15}\text{NH}_4^+$ afegit al sòl incrementant la proporció $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ respecte la proporció inicial, la immobilització no discriminarà en l'ús dels isòtops i per tant no farà variar la composició isotòpica. Les equacions utilitzades per a calcular les taxes brutes de formació i consum de N inorgànic tenen en compte, així doncs, el canvi de la composició isotòpica del producte enriquit com a resultat dels processos simultanis de producció i consum (Kirkham i Bartholomew, 1954). Un dels avantatges del mètode de “ ^{15}N isotope dilution” respecte altres mètodes d'enriquiment és que al marcar el producte de la reacció no s'alteren les taxes de producció de N inorgànic. Cal tenir en compte, però, que les taxes de consum de NH_4^+ o NO_3^- són susceptibles a ser sobreestimades a causa de l'addició de substrat per aquestes reaccions.

Aquest mètode, malgrat ens permet una bona estima de les taxes brutes de transformació del N, no està lliure d'inconvenients (Hart *et al.*, 1994) donat que: a) sí que existeix un petit fraccionament per part dels microorganismes durant la immobilització del N inorgànic, b) existeix la possibilitat que el ^{15}N afegit al sòl sigui remineralitzat durant el curs de la incubació, i c) les taxes poden sofrir grans variacions durant la incubació si el sòl és sotmès a pertorbació, per exemple al barrejar-lo, a l'humitejar-lo quan està molt sec o a l'afegir grans quantitats de substrat. Aquests inconvenients es resolen fent unes incubacions a curt plaç (de 1 a 3 dies) en sòls poc pertorbats.

Un altre punt a tenir en compte alhora de planificar un experiment d'enriquiment amb ^{15}N és la quantitat de mostra enriquida que cal afegir als sòls. Per una banda, si s'afegeix poc ^{15}N pot quedar camuflat en la quantitat d'abundància natural de ^{15}N present al sòl, però afegir-ne en excés pot modificar les taxes d'immobilització de N. Schimel (1993) proposa enriquir el sòl amb un 5-10 % més que el percentatge d'abundància natural (0.5% aprox.). Per altra banda, cal preveure quina concentració final de ^{15}N respecte el total de N hi haurà en les

mostres que s'analitzaran a l'espectròmetre de masses. Un percentatge al voltant del 5 % ens assegura una estima adequada que no supera el punt de saturació del sistema de mesura de l'aparell. Per calcular el percentatge final de ^{15}N caldrà tenir en compte: la concentració de N inorgànic al sòl, la quantitat de ^{15}N afegida, el percentatge d'enriquiment de la solució de ^{15}N (normalment un 99%), i la pèrdua de ^{15}N degut a la seva baixa recuperació alhora d'extreure el N inorgànic del sòl (es pot assumir en un 50%).

Una vegada realitzats tots aquests càlculs, es procedeix a preparar una solució de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o $^{15}\text{NKO}_3$ que s'injecta als sòls procurant que la repartició de la solució sigui el més homogènia possible (Hart *et al.*, 1994). La meitat dels sòls (inicials) s'extreuen immediatament amb KCl 2 M i s'analitzen les concentracions de NH_4^+ i NO_3^- , i l'altra meitat es deixen incubar. Passat el temps d'incubació es fan extractes amb els sòls restants (finals). Als pots amb els extractes de KCl inicials i finals s'afegeix un tros de paper de filtre acidificat amb K_2HSO_4 2.5 M i embolcallat amb cinta de teflon, la qual és impermeable als líquids però no als gasos, i a continuació s'afegeix MgO per basificar el medi causant que l'amoni (ara ja en forma de vapor de NH_3) sigui alliberat i capturat pel paper de filtre. Al cap de 6 dies, un cop la transferència ha estat completa, els papers de filtre es posen en un dessecador amb presència d' H_2SO_4 (que captura el NH_3 ambiental) i ja estan llestos per a ser analitzats a l'espectròmetre de masses. Per aquells sòls marcats amb $^{15}\text{NO}_3^-$ no s'afegeix el paper de filtre i es deixa que tot el NH_3 s'alliberi. Al cap de 6 dies s'afegeix aleació de Devarda, que redueix tot el NO_3^- a NH_4^+ , i es captura el NH_3 pel mateix procediment explicat anteriorment. Les anàlisis de l'espectròmetre de masses ens donen el % ^{15}N de la mostra i es calculen les taxes de mineralització bruta, consum de NH_4^+ , nitrificació bruta i consum de NO_3^- a partir de les equacions de Kirkham i Bartholomew (1954) (veure materials i mètodes dels capítols 4 i 6).

4.2. Efectes dels fenols en el cicle del N

L'alta concentració de fenols en algunes espècies vegetals podria tenir un profund efecte en el control de les interaccions sòl-planta, incloent la dinàmica de la matèria orgànica, la regulació dels cicles dels nutrients i en conseqüència la seva disponibilitat (Kuiters, 1990; Northup *et al.*, 1998; Schimel *et al.*, 1995).

Els fenols arriben al sòl per dues vies principals: formant part dels lixiviatos de les parts aèries i subterrànies de les plantes, i a través de la virosta (Hättenschwiler i Vitousek, 2000).

Malgrat existeixen pocs estudis comparatius, les quantitats alliberades durant la

descomposició es consideren més elevades que les quantitats presents als lixiviats del trescol (Kuiters, 1990). Els fenols que arriben al sòl a través dels lixiviats, i per tant són altament solubles, poden tenir quatre destins possibles: poden ser degradats i mineralitzats per microorganismes heterotròfics, poden ser transformats en substàncies húmiques insolubles i recalitrants per reaccions de polimerització i condensació amb la participació de microorganismes, poden ser absorbits per les argiles o formar quelats amb ions d'Al o Fe, o poden restar en forma soluble i ser lixiviats amb l'aigua de percolació abandonant així l'ecosistema en forma de carboni orgànic dissolt (Hättenschwiler i Vitousek, 2000). El destí dels fenols que entren al sòl amb la fullaraca depèn de la seva solubilitat. Així doncs, els fenols alliberats per la descomposició passen a formar part del compartiment de fenols solubles procedents dels lixiviats, juntament amb els compostos resultants de la descomposició de la lignina. Els fenols insolubles són degradats per part dels microorganismes o participen en la formació de complexos organo-minerals després de passar pel tracte intestinal de la fauna del sòl, el qual accelera la seva degradació (Hättenschwiler i Vitousek, 2000).

Donat que la disponibilitat de N normalment limita la producció vegetal (Vitousek i Horwarth, 1991) la majoria d'estudis dels efectes dels fenols al sòl s'han centrat en l'estudi del cicle del N. A continuació es presenten els efectes principals:

4.2.1. *Efectes en l'activitat microbiana*

Els fenols poden afectar directament a la composició i l'activitat de la flora microbiana del sòl a través d'efectes positius i negatius (Kuiters, 1990). Hi ha fortes evidències que els fenols tenen efectes negatius en el creixement de fongs ectomicorrízics (Rose *et al.*, 1983; Coté i Thibault, 1988). Boufalis i Pellisier (1994) van trobar que el consum d'oxigen de dos fongs ectomicorrízics era inhibit per quatre fenols presents a les substàncies húmiques a concentracions de 10^{-7} M, però que era estimulat a concentracions més elevades (10^{-3} M). El creixement de fongs que intervenen en la descomposició de la fullaraca pot ser també inhibit pels fenols, i els exoenzims poden ser inactivats a través de la formació dels complexos fenols-proteïna (Harrison, 1971). Per altra banda, el creixement i la respiració microbianes poden ser estimulades per la presència d'àcids fenòlics quan la flora del sòl els utilitza com a font de C (Blum i Shafer, 1988; Shafer i Blum, 1991; Schimel *et al.*, 1995; Sparling *et al.*, 1981; Sugai i Schimel, 1993).

4.2.2. Efectes en la descomposició i la mineralització del N

La capacitat dels fenols per formar complexos insolubles amb aminoàcids i proteïnes ha estat històricament debatuda com a factor que afecta la descomposició i mineralització de la fullaraca (veure Horner *et al.*, 1988). Aquests complexos s'originen durant la descomposició de la fullaraca quan els fenols emmagatzemats en les vacuoles entren en contacte amb les proteïnes citoplasmàtiques, o bé es formen directament al sòl a través dels fenols solubles lixiviat (Hättenschwiler i Vitousek, 2000). Els complexos fenols-proteïna són difícils de degradar i poden estabilitzar més del 60 % del N foliar (Kuiters, 1990). Malgrat que els tanins són els fenols principalment relacionats amb l'estabilització de N orgànic (Hagerman i Butler, 1991), els fenols simples poden formar complexos recalcitrants amb els aminoàcids, els quals participen en la síntesi de substàncies húmiques (Martin i Haider, 1980). Diversos estudis han associat la presència de tanins amb disminucions de les taxes de descomposició de la fullaraca (Nicolai, 1988; Palm i Sánchez, 1990) o de mineralització del N (Northup *et al.*, 1995; Palm i Sánchez, 1990; Palm i Sánchez, 1991; Schimel *et al.*, 1995) però en altres estudis no s'han trobat efectes significatius (Gallardo i Merino, 1993).

4.2.3. Efectes en la immobilització química de l'amoni

Els fenols de baix pes molecular tenen la capacitat de reaccionar amb NH_4^+ o NH_3 quan s'oxiden a quinones, formant polímers on el N quedaria molt estabilitzat enfront de l'atac microbià (Nommik i Vahtras, 1982; Stevenson, 1982).

4.2.4. Efectes en la immobilització biològica del N inorgànic

Tal com ja s'ha citat, els fenols simples, preferentment àcids fenòlics, poden ser utilitzats com a font de C per part dels microorganismes (Blum i Shafer, 1988; Schimel *et al.*, 1995; Shafer i Blum, 1991; Sparling *et al.*, 1981; Sugai i Schimel, 1993) incrementant així la immobilització del N inorgànic. També s'han trobat correlacions positives entre la immobilització de N en fullaraca i les concentracions de tanins de diverses espècies mediterrànies (Gallardo i Merino, 1992) i increments en el consum de NH_4^+ en sòls orgànics tractats amb tanins purificats de *Kalmia angustifolia* i *Abies balsamia* (Bradley *et al.*, 2000).

4.2.5. Efectes en la nitrificació

Elroy Rice, amb la publicació d'una revisió sobre al·lelopatia (Rice, 1974) va ser l'impulsor durant els anys 70 d'una hipòtesi que relacionava la disminució de la nitrificació observada al llarg de la successió amb la presència de metabòlits secundaris en plantes. No existeixen estudis concloents que aquests processos tinguin lloc en condicions naturals, malgrat s'han descrit *in vitro* efectes enlentidors o inhibidors per part de diversos fenols en la transformació de l'amoni a nitrit i del nitrit a nitrat (Baldwin *et al.*, 1983; Hartley i Whitehead, 1985).

4.3. Hipòtesis sobre la funció dels fenols al sòl

La majoria de les hipòtesis que intenten explicar el tipus i la quantitat de metabòlits secundaris presents a la vegetació es basen en els efectes deterrents contra els herbívors (veure apartat 2.4). En els últims anys, però, les hipòtesis que relacionen la presència de fenols amb increments de l'eficàcia biològica de les plantes productores de fenols a través de modificacions en les condicions nutricionals dels sòls han anat prenent força (Horner *et al.*, 1988; Muller *et al.*, 1987; Northup *et al.*, 1998). Els impulsors d'aquestes hipòtesis argumenten que les suposades funcions defensives del metabolisme secundari no sempre es mostren correlacionades amb un menor impacte dels herbívors sobre les plantes productores (per exemple veure Glyphis i Puttick, 1989), i que per tant no són suficients per explicar la presència dels fenols.

La hipòtesi plantejada per Horner *et al.* (1988) i Northup *et al.* (1998) parteix de la premissa que existeixen efectes recíprocs entre la presència de fenols i la qualitat nutricional de sòl. Tal com hem vist anteriorment, a) els fenols procedents de les fulles verdes o la virosta retarden la descomposició de la matèria orgànica i la mineralització, i per tant redueixen la disponibilitat de nutrients, i b) una baixa disponibilitat de N al sòl estimula la síntesi de fenols. Així doncs, existiria un procés de retroalimentació entre la producció de fenols i la disponibilitat de N, on la vegetació de llocs pobres en nutrients i altes concentracions de fenols reduiria encara més la qualitat nutricional del sòl mitjançant la reducció del *turnover* de la matèria orgànica (Chapin, 1993; Muller *et al.*, 1987).

Segons aquesta hipòtesi la síntesi de fenols suposaria un avantatge evolutiu per les espècies productores. La inhibició de la descomposició de la matèria orgànica a través de la formació dels complexos fenol-proteïna conservaria el N al sòl minimitzant les pèrdues de

N a través de la lixiviació o desnitrificació. En aquestes circumstàncies, les espècies productores de fenols maximitzarien l'adquisició del N de la fullaraca a través de l'acció de les ectomicorrizes i micorrizes ericoidals, les quals tenen la capacitat de degradar els complexos fenol-proteïna (Read, 1991). Les altes concentracions de fenols, per tant, serien seleccionades al llarg de l'evolució en aquelles plantes crescudes en ambients pobres en nutrients ja que aquest procés augmentaria la seva capacitat d'obtenció de nutrients (Bending i Read, 1996; Northup *et al.*, 1995, 1998). Aquest procés seria especialment beneficiós en aquells ecosistemes amb grans fluctuacions estacionals (Horner *et al.*, 1988). El recolzament experimental d'aquesta hipòtesi rau en les relacions inverses que s'han trobat entre les concentracions de fenols en fulla i la disponibilitat de nutrients al sòl al llarg d'un gradient d'acidesa (Northup *et al.*, 1995) però no s'ha demostrat encara que l'eficàcia biològica de les plantes productores de fenols estigui correlacionada amb la quantitat de fenols, ni que aquest procés sigui universal per a tots els ecosistemes terrestres.

Addicionalment, Northup *et al.* (1998) també plantegen que les espècies successionalment tardanes amb altes concentracions de tanins podrien augmentar la seva eficàcia biològica a través dels avantatges competitius que els conferiria la disminució de la disponibilitat de N al sòl. Les espècies productores de tanins, amb creixement lent, baixes taxes fotosintètiques, requeriments nutricionals baixos, poca resposta als pulsos de nutrients i amb capacitat d'obtenir N mitjançant micorrizes (Coley *et al.*, 1985) no resultarien tan afectades per la disminució de N sota la capçada com les espècies pioneres, de creixement ràpid, altes taxes fotosintètiques i requeriments nutricionals elevats.

OBJECTIUS I
APROXIMACIONS
EXPERIMENTALS

Aquesta tesi es divideix en dos grans blocs. En la primera part (capítols 1, 2 i 3) hem estudiat la resposta dels fenols a increments de les concentracions de CO₂. En la segona part (capítols 4, 5 i 6) hem estudiat l'efecte dels fenols en el cicle del N.

PART I: RESPOSTA DELS FENOLS A L'INCREMENT DE CO₂ ATMOSFÈRIC

OBJECTIUS

- Estudiar si la resposta dels fenols a concentracions elevades de CO₂ a nivell intraespecífic està determinada genèticament.
- Estudiar si la resposta dels fenols a increments de les concentracions de CO₂ a nivell intra- i interespecífic es pot explicar per les hipòtesis fenotípiques d'assignació de recursos (*Carbon-Nutrient Balance* i *Growth-Differentiation Balance hypotheses*).
- Estudiar si les concentracions de fenols a nivell intra- i interespecífic es poden explicar per les hipòtesis evolutives d'assignació de recursos (*Resource Availability hypothesis*).
- Estudiar si existeix variabilitat interespecífica en la resposta dels fenols a les concentracions elevades de CO₂ per espècies pertanyent a diferents grups funcionals.
- Determinar els efectes de la diversitat d'espècies i grups funcionals en una comunitat vegetal en la resposta dels fenols a increments de les concentracions de CO₂.
- Determinar la resposta de les concentracions de fenols en fullaraca a les concentracions elevades de CO₂ i discutir els efectes potencials del CO₂ en la descomposició de la fullaraca.
- Determinar els canvis en les concentracions de fenols en resposta a un increment de CO₂ a llarg termini en plantes crescudes en condicions naturals.

APROXIMACIONS EXPERIMENTALS

En aquesta primera part de la tesi hem volgut analitzar la resposta de diversos genotips i espècies vegetals a concentracions elevades de CO₂ en condicions properes a les naturals però a la vegada controlant les concentracions de CO₂ de manera acurada i minimitzant l'heterogeneïtat de les interaccions entre espècies vegetals, així com la presència d'herbívors.

Per això hem cultivat plantes obtingudes a partir de vegetació natural en hivernacles a dues concentracions de CO₂ (ambiental i elevat) on s'han simulat els règims de precipitació i lluminositat exteriors (capítols 1 i 2). Les plantes s'han obtingut a partir d'individus recol·lectats *in situ* i s'han plantat en unes parcel·les de sòls intactes extrets dels camps experimentals del CEFÉ-CNRS (Montpellier, França). Els individus s'han plantat seguint un patró definit prèviament per tal que cada un tingués el mateix nivell de competència per llum, aigua i nutrients. L'elecció d'aquest patró a l'hora de plantar les espècies ens ha permès estudiar la influència de l'increment de diversitat en la comunitat vegetal (és a dir, l'increment en el nombre d'espècies o de grups funcionals) en la producció de fenols. A continuació hem fet un pas més enllà per estudiar la resposta de la vegetació natural als increments de CO₂ atmosfèric analitzant les concentracions de fenols en 3 espècies que han crescut durant generacions a la vora de fonts naturals de CO₂ (Capítol 3). Amb aquest estudi hem volgut estudiar els efectes de l'increment de CO₂ a llarg termini integrant a la vegada els efectes de la disponibilitat de recursos i competència entre espècies en condicions naturals.

PART II: EFECTES DELS FENOLS EN EL CICLE DEL N

OBJECTIUS

- Estudiar si la presència de lixiviats vegetals amb alt contingut de fenols provoquen canvis en les taxes netes i brutes de transformació del N al sòl.
- Determinar quins processos específics del cicle del N resulten afectats, incloent canvis en la mineralització, nitrificació o immobilització.
- Determinar si els lixiviats vegetals alliberats al sòl poden ser responsables dels canvis en el cicle del N produïts per la presència de vegetació.
- Determinar si els canvis en el cicle del N produïts pels lixiviats vegetals estan causats per fenols o bé per altres compostos presents als lixiviats.
- Determinar si els efectes dels lixiviats vegetals són variables en dos ecosistemes amb elevada presència de plantes productores de fenols (boreals i mediterranis) però diferent climatologia.
- Estudiar si els efectes dels lixiviats vegetals són variables en sòls amb diferents propietats físico-químiques.

- Determinar si la disponibilitat de N sota la capçada d'una planta productora de fenols resulta afectada en relació amb la disponibilitat de N en sòl un.
- Determinar si existeix una retroalimentació positiva entre la producció de fenols en planta i la disponibilitat de N al sòl.

APROXIMACIONS EXPERIMENTALS

En la segona part de la tesi hem volgut determinar si els fenols lixiviatos de fulles verdes i fullaraca tenen algun efecte en el cicle del N en condicions naturals. Experiments preliminars realitzats amb diverses espècies boreals (*Ledum palustre*, *Empetrum hermaphroditum*, *Sphagnum sp*, *Hyloconium sp*) ens van revelar que l'addició de lixiviatos al sòl feia reduir les taxes de mineralització neta del N i que aquest efecte era proporcional a les concentracions de fenols presents als lixiviatos (dades no incloses). Aquests resultats ens van fer preguntar si els fenols alliberats per la planta eren quantitativament prou importants per tenir un efecte sota la capçada. Per tant, en primer lloc hem estudiat les diferències en el cicle del N entre sòls sota capçada i sòls control, i hem comparat aquests efectes amb l'addició de lixiviatos procedents de fulles verdes o fullaraca. En un pas posterior, hem fraccionat els compostos presents en els lixiviatos en una fracció fenòlica i una fracció no-fenòlica per veure si els efectes dels lixiviatos procedien dels fenols o bé d'altres compostos solubles. L'estudi dels efectes dels fenols al sòl d'una espècie boreal (*Ledum palustre*) i una espècie mediterrània (*Cistus albidus*), ambdues amb la capacitat de lixiviar una gran concentració de fenols, ens permet veure si els efectes dels fenols són variables en ecosistemes de grans diferències climàtiques. Addicionalment, i atès que a Catalunya disposem d'una litologia molt variada, hem volgut veure si els efectes dels fenols al cicle del N són variables per una mateixa espècie sotmesa a condicions climatològiques similars en sòls de característiques físico-químiques molt diferenciades. Finalment, per tal d'estudiar l'impacte de la producció dels fenols en el sistema sòl-planta i la possible selecció dels fenols al llarg de l'evolució en base als efectes en el cicle del N, hem estudiat les relacions recíproques entre la producció de fenols en planta i el cicle del N.

CONSIDERACIONS GENERALS

En ambdues parts d'aquesta tesi ens hem decantat per realitzar uns estudis més encarats a resoldre qüestions ecològiques i no tant en estudiar processos fisiològics o edafològics, o aprofundir en la química dels fenols mitjançant la purificació, identificació i quantificació de compostos. Des del nostre punt de vista, i segons els objectius que ens hem marcat en la tesi, l'ús dels fenols totals té diverses avantatges. Malgrat que la quantificació dels fenols totals no ens permet resoldre qüestions molt acurades, per exemple saber si tots els compostos fenòlics resulten igualment afectats per l'increment de concentracions de CO₂ atmosfèric o bé si les diverses classes de compostos fenòlics afecten de manera diferent el cicle del N, és una eina molt útil alhora d'estudiar la seva funció global en els ecosistemes. Donat que existeixen encara moltes preguntes sobre si els efectes dels fenols són significatius en condicions naturals pensem que l'ús dels fenols totals és un bon punt de partida per decidir si val la pena aprofundir en aquest camp.

Per últim, fer un incís sobre els motius que ens han portat a realitzar al llarg d'aquesta tesi dos tipus d'estudis tan diferenciats com són la resposta dels fenols al CO₂ i l'efecte dels fenols en el cicle del N. El tema d'interès comú i punt de partida d'aquestes recerques ha estat l'estudi dels fenols en ecologia, però dins aquest immens i encara lleugerament explorat camp la tria d'aquests dos temes ha estat fruit de l'atzar i la necessitat. Malgrat és obvi que existeixen punts de connexió entre els dos temes (a tall d'exemple, si l'increment de CO₂ atmosfèric modifica les concentracions de fenols és plausible que això tingui repercussions sobre el cicle del N) no és l'objectiu d'aquesta tesi fer una anàlisi conjunta dels dos processos. Pensem que, donada l'alta variabilitat específica i la complexitat dels ecosistemes, intentar realitzar prediccions sobre les variacions en el cicle del N a través dels canvis en les concentracions de fenols vegetals en un ambient amb elevades concentracions de CO₂ seria massa agoserat a partir dels estudis que presentem a continuació. De totes maneres, esperem que aquests estudis sí que contribueixin a determinar l'impacte de les variacions de fenols en la dinàmica dels ecosistemes en un escenari de canvi global.

RESULTATS (I)

RESPOSTA DELS FENOLS A L'INCREMENT DE CO₂ ATMOSFÈRIC

Capítol 1

1. Intraspecific variability of phenolic concentrations and their responses to elevated CO₂ in two mediterranean perennial grasses

E. CASTELLS¹, C. ROUMET², J. PEÑUELAS¹ and J. ROY²

¹Unitat d'Ecofisiologia CSIC-CREAF, CREAF (Centre de Recerca Ecològica i Aplicacions Forestals) Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain.

²CEFE (Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive) CNRS. 1919 Route de Mende. 34293 Montpellier cedex 5. France.

(acceptat a Environmental and Experimental Botany, 2001 i pendent de publicació)

1.1. Abstract

Intraspecific variability of total phenolic compound concentrations and their responses to elevated CO₂ were studied in two wild Mediterranean perennial grasses, *Dactylis glomerata* and *Bromus erectus*. Ten and nine genotypes of each species were grown in climate-controlled naturally-lit glasshouses under plant intergenotypic and interspecific competition for water, light and nutrients. Carbon source-sink balance hypotheses of resource allocation were also tested. Elevated CO₂ induced changes in shoot biomass (DM), leaf total non-structural carbohydrate concentrations ([TNC]) and leaf nitrogen concentrations ([N]) found in a previous study (Roumet *et al.*, 1999) were related to changes in phenolic compound concentrations.

Phenolic compound concentrations increased 15.2 % DM in *Dactylis glomerata* and 86.9 % DM in *Bromus erectus* under elevated CO₂. These changes were more pronounced when expressed on a structural dry mass basis (DM_{st}). Increases in DM_{st} and [TNC_{st}] and decreases in [N_{st}] were also found according to current resource allocation hypotheses. However, there were no proportional changes between phenolic responses to elevated CO₂ and DM_{st}, [TNC_{st}] and [N_{st}] responses. Phenolic concentrations were highly determined by genetics in both species but all studied genotypes responded in a similar way to elevated CO₂. Considering the present experiment conditions, with plants growing in intraspecific and interspecific competition, the absence of CO₂ x genotype interaction would lead to little changes of fitness in terms of antiherbivore chemical defense, and therefore to low evolutionary consequences in CBSC under the increasing atmospheric CO₂ concentrations of the next decades.

1.2. Introduction

Elevated CO₂ is widely reported to increase plant biomass (Kimball, 1983; Poorter *et al.*, 1996) and leaf total non-structural carbohydrate ([TNC]) concentrations (Farrar and Williams, 1991; Koricheva *et al.*, 1998), and to decrease leaf nitrogen ([N]) concentration (McGuire *et al.*, 1995; Koricheva *et al.*, 1998). In most literature studies it is also reported that concentrations of some carbon-based secondary compounds (CBSC), such as phenolics, usually increase under elevated CO₂ (Lavola *et al.*, 1998 and references reviewed in Peñuelas and Estiarte, 1998). Phenolics are involved in plant antiherbivore defense functions and can also affect organic matter decomposition (Lambers, 1993; Peñuelas and Estiarte, 1998). Levels of CBSC are partly under genetic control and partly determined by environmental conditions (Jones and Hartley, 1999). Resource allocation hypotheses such as Carbon/Nutrient Balance (CNB) (Bryant *et al.*, 1983) and Growth Differentiation Balance (GDB) (Loomis, 1932; Herms and Mattson, 1992) have been proposed to predict the effect of environmental factors. They assume that changes in carbon source-sink relationships, as a consequence of reducing nutrient availability or modifying carbon availability, determine variations in the relative partitioning of carbon to growth, CBSC and TNC. Predictions of these hypotheses can be tested by increasing CO₂. The consequent rise of the carbon/nutrient availability ratio limits growth more than photosynthesis, which results in an accumulation of TNC and a decrease in [N] (Bazzaz, 1990; Herms and Mattson, 1992; Peñuelas and Estiarte, 1998; Wolfe *et al.*, 1998). When protein synthesis is restricted under high carbon/nitrogen availability ratio, the consequent lower demand of amino acids could determine the stimulation of phenolic compounds synthesis (Margna, 1977). Two hypotheses have been proposed to explain the increases of CBSC under these conditions. Baas (1989) considers that TNC in excess of those required for protein synthesis is the main factor affecting the increases of CBSC concentrations under elevated CO₂. On another hand, Jones and Hartley (1999) and Lambers (1993) involve the presence of a common precursor between proteins and phenolics, the amino acid phenylalanine. Protein and phenolic competition for limiting phenylalanine results in a trade-off between rates of protein versus phenolic synthesis and thus an inverse relation between protein and phenolic allocation. The two hypotheses seem compatible since they both consider the increase of CBSC under elevated CO₂ to result from a metabolic excess of carbon with no physiological costs on growth. Negative relationships between CBSC and growth are expected because increases in growth along a gradient of increasing nutrient availability will result in less carbon available for CBSC production (Bryant *et al.*, 1983).

The genetic variation in CBSC production has been less studied. Do the CNB or GDB hypotheses work for differences among genotypes as well as among species? More than 50 % of the observed variation of carbon-based secondary metabolites concentrations within a species is explained by genetic variation (Berenbaum and Zangerl, 1992; Hamilton *et al.*, 2001). There are few studies on CBSC responses to elevated CO₂ among genotypes of a species (Fajer *et al.*, 1992; Goverde *et al.*, 1999; Mansfield *et al.*, 1999) and they showed a variety of results. Thus, Goverde *et al.* (1999) and Mansfield *et al.* (1999) found increases in condensed tannins at elevated CO₂ as well as genotype x CO₂ interactions for this parameter whereas Fajer *et al.* (1992) found no significant changes for 4 carbon-based allelochemicals at elevated CO₂. No studies on the response of genotypes at elevated CO₂ have been conducted in plant communities growing under competition for water, light and nutrients. Phenolic compounds are usually considered plant defense against herbivores and their concentrations may respond to natural selection. If there were a genetic basis for the phenolic response to elevated CO₂, predicted increases of atmospheric CO₂ could change the genetic composition of populations and have evolutionary consequences.

The correlation among physiological parameters of different genotypes could also be interpreted through evolutionary hypotheses, such as Resource Availability hypothesis (Coley *et al.*, 1985). This hypothesis state that plant investments on growth or secondary metabolism depend on the resource availability where this plant evolved. Thus, plants growing in a resource limitation environment with inherent slow-growing rate will enhance their fitness against herbivores by allocating more resources to chemical defense, while plants less nutrient limited will be more favored by allocating resources to growth (Coley *et al.*, 1985). Since constitutive investments in phenolic compounds are assumed to have a phenotypic cost (Baldwin *et al.*, 1990), a negative trend between growth and phenolic concentrations of different genotypes grown with similar resource availability is generally expected (Coley *et al.*, 1985; Han and Lincoln, 1994; Bryant and Julkunen-Tiitto, 1995).

Genotypes of two Mediterranean perennial grasses, *Dactylis glomerata* and *Bromus erectus*, have been grown together in competition for resources in ambient and elevated CO₂ conditions. In a previous study (Roumet *et al.*, 1999), these species have been shown to present genotypic variation in dry mass (DM), [TNC], and [N] and in the plasticity of these parameters when exposed to elevated CO₂, although the response was always stronger in *D. glomerata* than in *B. erectus*. Under elevated CO₂, DM and [TNC] increased while [N] decreased in both species. In *D. glomerata* there was genotypic variability for [N] in response

to elevated CO₂ whereas all genotypes of *B. erectus* had similar responses at elevated CO₂ (Roumet *et al.*, 1999).

Here we aimed to study the role of genetic diversity in the response of plant phenolics to elevated CO₂ concentrations. We first examined the genetic variability of phenolic compounds for different genotypes belonging to these two species grown at either ambient or elevated CO₂. Second, we tested the hypotheses i) that phenolic compound concentrations would increase at elevated CO₂ considering overall genotypes within each species and that these increases would correlate with increases in DM and [TNC] and decreases in [N] following the resource allocation hypotheses, and ii) that relationships between absolute values of phenolics compound concentrations and absolute values of DM at each CO₂ level would follow the evolutionary Resource Availability hypothesis (Coley *et al.*, 1985). Finally, third, we discuss the genetic variability of phenolic compound responses to elevated CO₂ for different genotypes belonging to these two species and its evolutionary consequences.

1.3. Materials and methods

Fourteen genotypes of *Dactylis glomerata* L. and fourteen of *Bromus erectus* Huds., two perennial species commonly found in Mediterranean rangelands, were sampled in a calcareous grassland near Montpellier (43-38' N, 3-52' E) (France) in April 95. Along a transect, one individual of each species was collected every 5 m. As both species are caespitose grasses forming small clumps (5-30 cm in diameter), each individual can probably be considered a distinct genotype (R. Lumaret, pers. comm.). Each genotype was cloned by separating its tillers. Ramets were then grown in pots under productive conditions. In October 1995, they were cloned again before being transplanted into intact, non-fertilized soil monoliths (71 x 71 x 30 cm) excavated from an old field at CNRS, Montpellier. The soil is a clay loam with low levels of organic matter (1.8-2.5 %), pH 8, C 1.2 %, N 1.2 mg kg⁻¹ and P(Olsen) 13 mg kg⁻¹. In each monolith, twelve ramets per genotype and per species were grown (336 plants in total), providing a plant density of about 700 plants per m². Ramets of *B. erectus* and *D. glomerata* were planted in rows. Distance between rows was 3.5 cm and between plants on a row 4 cm. On a row, ramets of each species were alternately planted and, within a species, genotypes were randomly arranged. The relative arrangement of species and genotypes was strictly identical at ambient and elevated CO₂. Eight monoliths were used, spread over four naturally lit, climate controlled, glasshouses. Temperature and humidity in the glasshouses were

tracking outside conditions. The global radiation inside the greenhouses ranged from 3 MJ m⁻² day⁻¹ (in November) to 7.5 MJ m⁻² day⁻¹ (in March). Two glasshouses were run at 350 μmol mol⁻¹ atmospheric CO₂ and two at 700 μmol mol⁻¹ atmospheric CO₂. The monoliths were rotated within each glasshouse every 2 months to avoid a position effect within the greenhouse. They were watered with deionized water when leaf water potential fell under 0.4 MPa.

Plants were harvested in late March, i.e. during the peak of vegetative growth. In order to minimize border effects, in each monolith, shoots of the 168 central plants (six replicates per genotype and per species) were harvested by clipping plants at the soil surface. Shoots were oven-dried for 48 h at 60 °C prior weighing.

Leaf nitrogen concentration ([N]) was determined on three replicates per genotype and per monolith with a Carbon-Hydrogen-Nitrogen analyser (Carlo Erba instruments, model EA 1108, Milano, Italy). Leaf total non-structural carbohydrate (TNC) analysis, which include both soluble sugars and starch, was carried out following the method of Farrar (1993). Additional information on growth conditions and chemical analysis can be found in Roumet *et al.* (1999).

Phenolic compound concentration was determined on the same genotypes used for SDM, TNC and N measures with enough dry matter to carry the analysis (nine genotypes for *B. erectus* and ten for *D. Glomerata*) and on 4 replicates (three plants bulked together) per genotype. Grounded sample (ca 50 mg) were extracted with methanol 70 % for 45 min. Total phenolic compounds were analyzed by Folin-Ciocalteu method, improved by using a blank of polyvinylpyrrolidone (PVPP) (Marigo, 1973). PVPP removes phenolic substances from the solution and avoids overestimation of total phenolics due to non-phenolics Folin-Ciocalteu reactive substances. Gallic acid was used as standard to estimate concentrations of phenolic compounds. Total phenolic analyses is a measure of the reactivity of phenolic compounds irrespective of the particular molecules in which they occur (Waterman and Mole, 1994). Data were expressed per unit of total dry mass (DM) and per unit of structural dry mass (DM_{st}). DM_{st} was obtained by subtracting tissue TNC mass from the total dry mass.

In order to assess the level of genetic determination in the production of phenolic compounds considering both CO₂ levels ⁽¹⁾ as well as the genetic variation of phenolic compound concentrations in the response to CO₂ ⁽²⁾, broad-sense heritabilities (H²) were calculated from mixed-model analyses of variance (Falconer and Mackay, 1996). H² was calculated using variance components (S²).

$$(1) \quad H^2 = S^2_{\text{genotype}} / (S^2_{\text{genotype}} + S^2_{\text{genotype} \times \text{CO}_2} + S^2_{\text{error}})$$

$$(2) \quad H^2 = S^2_{\text{genotype} \times \text{CO}_2} / (S^2_{\text{genotype}} + S^2_{\text{genotype} \times \text{CO}_2} + S^2_{\text{error}})$$

The statistical design consisted of a split-plot arrangement of treatments with CO₂ treatment as the main plot factor, and species and genotypes (nested within species) as the sub-plot factors. The CO₂ treatment was allocated at random, each to a different greenhouse; species and genotypes effects were applied within each glasshouse. As proposed by Potvin (1993) for this particular glasshouse design, data were analyzed using a mixed model of analyze of variance (ANOVA) with CO₂ and species as fixed effects, and greenhouse within CO₂ and genotypes within species as random effects. The effect of CO₂ was tested against the random effect of greenhouse nested within CO₂ and the species effect against genotype (species) mean square. The inter-specific differences in the response to CO₂ (CO₂ x species interaction) were tested using the CO₂ x genotype (species) interaction mean square, while the intraspecific variability in the response to CO₂ (CO₂ x genotype interaction) was tested against the residual mean square. ANOVAs were also carried out separately for each species to test whether intraspecific variability in the response to CO₂ was present in each of the two species. All data were checked for normality before statistical tests. Split-plot analyses were conducted with the statistical analysis software SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). Relationships between parameters were tested by linear regression using Statistica 5.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, USA).

1.4. Results

Effects of elevated CO₂ on phenolics

Overall, phenolic compound concentrations increased significantly when species were grown under elevated CO₂ (Table 4). For *D. glomerata*, phenolics increased significantly by 15.2 % and 21.4 % when expressed on a total or structural dry mass basis respectively (phenolic_{st}) (Fig.3, Table 4). Compared with *D. glomerata*, the phenolic compound concentrations of *B. erectus* was six to seven times lower. For *B. erectus* the increase of phenolic compound concentrations due to elevated CO₂ was large (86.9% and 88.2% when expressed on a total or structural dry mass, respectively) but not statistically significant (Fig. 3, Table 4).

	SDM		[TNC _{st}]		[N _{st}]	
	Ambient CO ₂	Elevated CO ₂	Ambient CO ₂	Elevated CO ₂	Ambient CO ₂	Elevated CO ₂
<i>D. glomerata</i>						
1	0.30 ± 0.04	0.43 ± 0.02	178.0 ± 19.4	335.4 ± 31.4	2.68 ± 0.09	2.58 ± 0.08
2	0.39 ± 0.10	0.51 ± 0.13	217.2 ± 29.4	277.8 ± 18.6	3.01 ± 0.12	2.53 ± 0.06
3	0.33 ± 0.02	0.40 ± 0.15	158.5 ± 19.1	275.4 ± 21.7	2.68 ± 0.05	2.57 ± 0.11
4	0.15 ± 0.03	0.29 ± 0.05	222.3 ± 8.2	269.8 ± 30.4	2.88 ± 0.16	2.40 ± 0.05
5	0.29 ± 0.09	0.35 ± 0.11	132.5 ± 10.4	189.6 ± 21.1	3.06 ± 0.11	2.58 ± 0.11
6	0.31 ± 0.09	0.36 ± 0.08	178.0 ± 27.0	253.5 ± 19.6	2.86 ± 0.03	2.66 ± 0.05
7	0.16 ± 0.04	0.24 ± 0.04	180.7 ± 13.0	270.8 ± 40.6	2.99 ± 0.10	2.66 ± 0.06
8	0.33 ± 0.04	0.35 ± 0.07	215.1 ± 39.6	217.8 ± 10.9	2.78 ± 0.11	2.51 ± 0.09
9	0.37 ± 0.08	0.49 ± 0.13	228.1 ± 19.0	229.9 ± 26.9	2.76 ± 0.10	2.52 ± 0.18
10	0.64 ± 0.13	0.69 ± 0.12	207.1 ± 25.0	277.1 ± 10.3	2.70 ± 0.05	2.49 ± 0.05
<i>B. erectus</i>						
1	0.14 ± 0.02	0.20 ± 0.07	130.3 ± 9.6	196.1 ± 20.3	3.05 ± 0.35	3.07 ± 0.15
2	0.16 ± 0.04	0.18 ± 0.04	86.9 ± 7.2	134.8 ± 15.1	2.65 ± 0.20	2.55 ± 0.10
3	0.16 ± 0.01	0.19 ± 0.01	116.3 ± 12.5	91.1 ± 12.3	2.82 ± 0.24	2.46 ± 0.08
4	0.13 ± 0.02	0.22 ± 0.05	87.2 ± 8.0	95.7 ± 13.2	2.85 ± 0.10	2.92 ± 0.11
5	0.21 ± 0.04	0.28 ± 0.03	120.2 ± 14.5	122.0 ± 14.6	2.62 ± 0.20	2.45 ± 0.07
6	0.39 ± 0.11	0.36 ± 0.02	101.8 ± 16.0	103.4 ± 9.4	2.91 ± 0.22	2.55 ± 0.07
7	0.20 ± 0.05	0.22 ± 0.03	74.7 ± 6.5	83.3 ± 6.4	2.97 ± 0.16	2.73 ± 0.06
8	0.11 ± 0.03	0.14 ± 0.03	101.9 ± 14.6	189.0 ± 77.4	3.00 ± 0.29	3.38 ± 0.26
9	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01	136.9 ± 21.2	128.2 ± 12.7	2.95 ± 0.10	2.46 ± 0.14

Table 3. Mean and SE of Structural dry mass (SDM), total non-structural carbohydrate concentrations ([TNC_{st}]) and nitrogen concentrations ([N_{st}]) expressed on a dry mass basis for genotypes of *D. glomerata* and *B. erectus* growing at ambient CO₂ (350 μmol mol⁻¹) and elevated CO₂ (700 μmol mol⁻¹) (Roumet *et al.*, 1999).

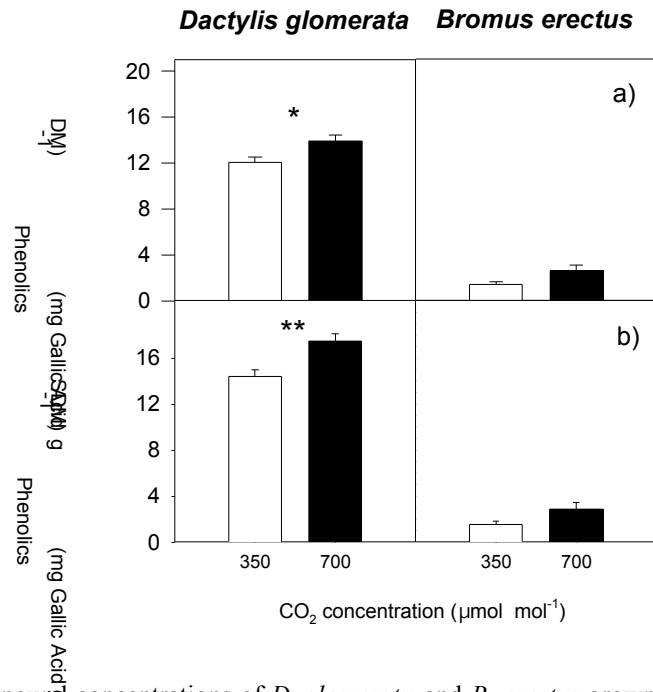


Figure 3. Phenolic compound concentrations of *D. glomerata* and *B. erectus* grown at ambient CO₂ (350 μmol mol⁻¹) and elevated CO₂ (700 μmol mol⁻¹) expressed on a dry mass basis (a) and on a structural dry mass basis (b). Values are means ± SE n=40 for *D. glomerata* and n=36 for *B. erectus*, 4 replicates for each one of the genotypes (each analysis was conducted on samples consisting of two plants bulked together). Significance levels : * p<0.1, ** p<0.05.

Within each species, genotypes had significantly different phenolic concentration (Fig. 4, Table 4). However, they did not differ significantly for their response to elevated CO₂ since the CO₂ x genotype interaction was not significant (Table 4). Only three genotypes of *D. glomerata* and one genotype of *B. erectus* presented a significant increase in phenolic concentrations at elevated CO₂ ranging from 39.9 % to 477% when expressed on dry mass basis (data not shown) or on structural dry mass basis (Fig. 4). The statistically insignificant increase of phenolic compounds under elevated CO₂ in the other genotypes was partially due to the variation of phenolic concentrations at intragenotypic level. Genotypes had stronger effect than elevated CO₂ on phenolic_{st} concentrations in both species: broad-sense heritabilities were 0.72 for *D. glomerata* and 0.76 for *B. erectus* suggesting that the observed intraspecific variation is mostly genetic. Heritability of phenolics_{st} response to elevated CO₂, however, was low in both species (0.09 in *D. glomerata* and 0.08 in *B. erectus*). Thus, genotypes had similar responses to elevated CO₂ despite genetic differences in absolute phenolic concentrations.

	[Phenolics]			[Phenolics _{st}]	
	<i>ddf</i>	<i>MS</i>	<i>p-level</i>	<i>MS</i>	<i>p-level</i>
Both species					
Main plot					
CO ₂	1	92.206	0.004	194.056	0.0008
Main plot error	2	0.342		0.146	
Sub plot					
Species	1	4610.95	<0.0001	7178.578	<0.0001
Species * CO ₂	1	3.009	0.383	25.339	0.030
Genotype (Species)	17	25.608	<0.0001	36.744	<0.0001
Genotype (Species) * CO ₂	17	3.745	0.874	4.542	0.943
Sub plot error	112	6.091		8.893	
<i>D. glomerata</i>					
Main plot					
CO ₂	1	67.694	0.068	189.236	0.019
Main plot error	2	5.071		3.622	
Sub plot					
Genotype	9	31.263	0.0005	48.069	0.0007
Genotype * CO ₂	9	5.195	0.734	6.377	0.860
Sub plot error	58	7.779		12.465	
<i>B. erectus</i>					
Main plot					
CO ₂	1	29.325	0.149	37.354	0.124
Main plot error	2	5.597		5.666	
Sub plot					
Genotype	8	19.245	0.0002	24.003	0.0002
Genotype * CO ₂	8	2.115	0.834	2.478	0.846
Sub plot error	52	4.045		4.898	

Table 4. Mean square (MS) and significance probabilities resulting from a split-plot ANOVA testing the effect of CO₂, species and genotype within species, on phenolic compounds concentrations of different genotypes of the two species *B. erectus* and *D. glomerata*. Phenolic concentrations were expressed both on a total dry mass basis

[Phenolics] or on a structural dry mass basis [Phenolics_{st}]. ANOVAS were carried out either for the two species pooled together or separately for each species. **P < 0.05** are highlighted in bold.

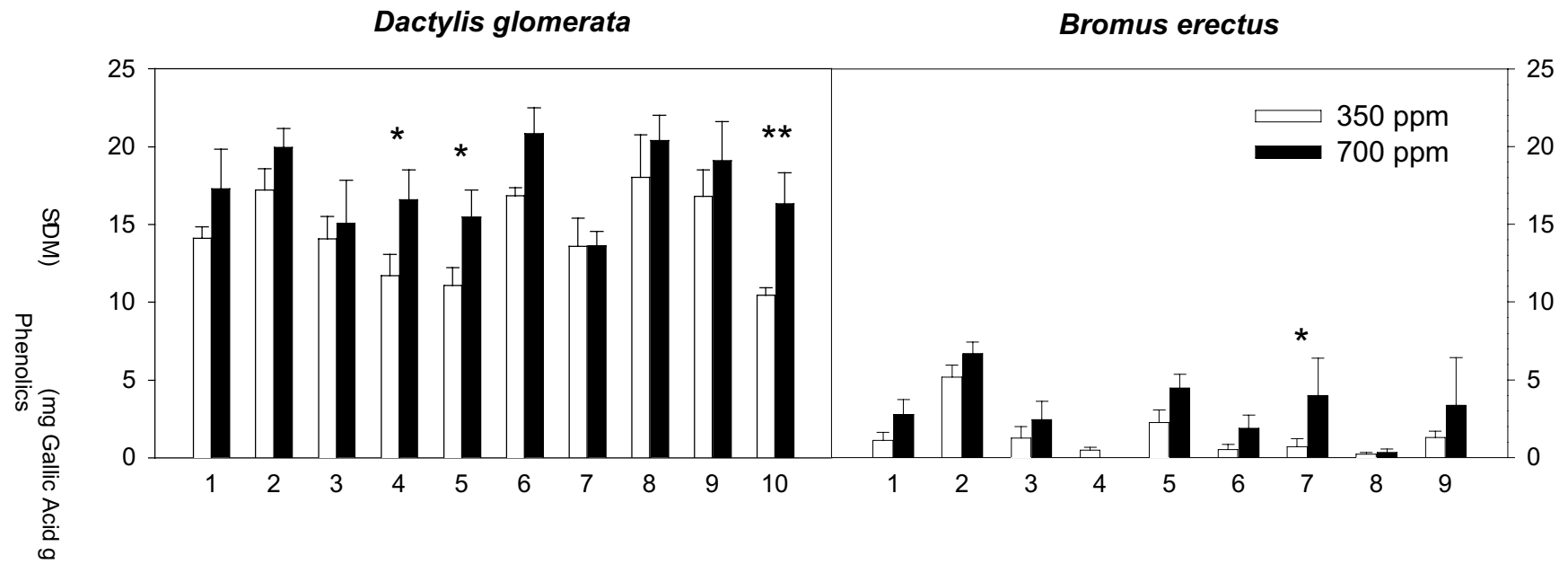


Figure 4. Phenolic compound concentrations on structural dry mass basis of the different genotypes of *D. glomerata* and *B. erectus* grown at ambient and elevated CO₂. Significance levels: * p<0.1, ** p<0.05.

Genotypes of *D. glomerata* and *B. erectus* globally increased their DM and TNC expressed on structural dry mass basis (DM_{st} and TNC_{st} , respectively) and phenolic_{st} concentrations, and decreased their [N] expressed on structural dry mass basis ($[N_{st}]$) at elevated CO_2 (Fig. 5, Table 3 and Roumet *et al.*, 1999). However, there was no significant linear relationship between changes in phenolic_{st} concentrations and changes in genotype DM_{st} , $[TNC_{st}]$ or $[N_{st}]$ in any of the two species *B. erectus* and *D. glomerata* (data not shown). There was only a tendency for a negative trend between changes on phenolic_{st} concentrations and DM_{st} in both species.

When, at each level of CO_2 , across-genotypes variability in phenolics was analyzed in relation to DM_{st} , $[TNC_{st}]$, and $[N_{st}]$, few relationships were found significant (Fig. 5). Phenolic_{st} concentrations in *D. glomerata* were significantly related to their structural dry mass at ambient CO_2 only when excluding a genotype which had significant large structural dry mass compared to the other genotypes. In *B. erectus*, phenolic_{st} concentrations were negatively related with $[N_{st}]$ both at ambient and elevated CO_2 .

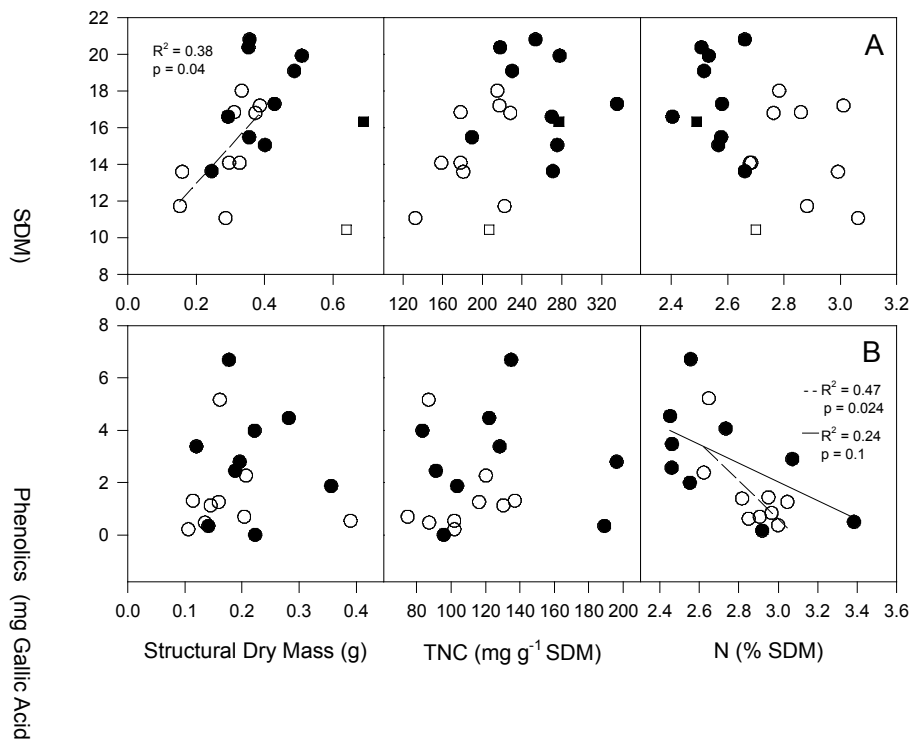


Figure 5. Genotypic relationships from *D. glomerata* (A) and *B. erectus* (B) of structural dry mass, total non-structural carbohydrates concentrations (TNC) and nitrogen concentrations (previously described in Roumet *et al.*, 1999) with phenolic compound concentrations both expressed on a structural dry mass basis. Each value corresponds to one genotype at ambient CO_2 (open symbols) and elevated CO_2 (close symbols) ($n = 4$). Regression line for structural dry mass and phenolic compounds in *D. glomerata* excludes one genotype (squares) which had significant large biomass compared to the other genotypes. Regressions between N and phenolic compounds in *B. erectus* are represented for ambient CO_2 (dotted line) and elevated CO_2 (full line).

1.5. Discussion

Testing resource allocation hypothesis for CO₂ response

Average response of CBSC to elevated CO₂ for *D. glomerata* and *B. erectus* were in agreement with the prediction of resource allocation hypotheses (Loomis, 1932; Bryant *et al.*, 1983; Herms and Mattson, 1992; Peñuelas and Estiarte, 1998). Species response under elevated CO₂ followed the expected general trends; *i.e.* increases in phenolic concentrations were accompanied by increases in DM and [TNC] and decreases in [N]. Resource allocation hypotheses predict negative relationships between changes in growth and changes in phenolic compound concentrations at elevated CO₂ caused by a physiological trade-off between both processes, as well as positive relationships between changes in phenolics and changes in TNC, and negative relationships between changes in phenolics and changes in [N] (Loomis, 1932; Bryant *et al.*, 1983; Herms and Mattson, 1992; Peñuelas and Estiarte, 1998). These hypotheses consider the phenotypic response of plants, *i.e.* the response of a genotype under different resource availability.

At the inter-genotype level, these hypotheses were, however, not confirmed. Despite a large variability in CO₂ response of [TNC_{st}], [N_{st}] and phenolics_{st} among genotypes, changes in genotype phenolic_{st} concentrations due to elevated CO₂ were not linearly related with changes produced in DM_{st}, [TNC_{st}] or [N_{st}] in any of the two species *B. erectus* and *D. glomerata*. The non-proportional changes between phenolic_{st} concentrations and [N_{st}] has also been found by Poorter *et al.* (1997) in a study comparing the response of 27 herbaceous species. Why the effect of elevated CO₂ on phenolics of our genotypes was so unpredictable and different from the predictions of the CNB can be explained by the highly variable response to CO₂ of photosynthetic rates within a species which is only poorly related with biomass response (Wang *et al.*, 2000). Considerable variation in phenolic response to elevated CO₂ has also been found in other studies (Hartley *et al.*, 2000). Moreover, a physiological trade-off between carbon allocated to phenolics and carbon allocated to growth is only apparent when photosynthesis stimulation to elevated CO₂ is quantitatively similar among genotypes and thus equivalent amounts of carbon are allocated to both functions (Castells, pers. comm.). If photosynthetic rates increase under elevated CO₂, the higher allocation of assimilated carbon to biomass and to phenolics creates the possibility for positive correlations between secondary metabolism and growth as well as for a lack of correlations despite a competition for a common resource base (Herms and Mattson, 1992). Moreover, phenotypic

plasticity of CBSC, that is the amount by which the expression of CBSC of a genotype are changed by different environments, have been shown to vary among genotypes (Julkunen-Tiitto *et al.*, 1995). An alternative explanation for this lack of relationship is that only some CBSC respond according to the CNB prediction and total phenolics may not be a representative measure of these (Koricheva *et al.*, 1998).

Testing resource allocation hypothesis for intraspecific differences in phenolic compound concentrations

Plant phenolic compound concentrations of *D. glomerata* and *B. erectus* were highly dependent on plant genetics as shown by differences at both interspecific and intraspecific levels. These results are in agreement with previous studies where high heritabilities of concentrations of diverse phenolic compounds were found in *Prunus* (Nachit and Feucht, 1983), *Phaseolus* (Ma and Bliss, 1978), *Plantago lanceolata* (Fajer *et al.*, 1992), *Salix sericea* (Nichols-Orians *et al.*, 1993; Orians *et al.*, 1996) and *Diplacus auratiacus* (Han and Lincoln, 1994), and indicate a substantial genetic influence on phenotypic variability of CBSC concentrations. There is thus high intraspecific and interspecific potential for selective processes linked to herbivory.

No clear intergenotypic relationships between DM and phenolic compounds were found at either CO₂ level. Except for weak negative relationship between [N_{st}] and phenolic_{st} concentrations in *B. erectus* genotypes, these results do not fit to evolutionary resource allocation hypotheses which predict negative relationships between growth and chemical defense. We cannot discard, however, the allocation of phenolic compounds to other plant parts different from leaves. Reported results in the literature are variable. Genotype growth rates of *Diplacus auranticus* (Han and Lincoln, 1994) and *Psychotria horizontalis* (Sagers and Coley, 1995) were found to be negatively correlated with genotype phenolic resin concentrations and total tannin concentration, respectively. However, no relationships between plant growth and CBSC concentrations within genotypes were found in *Salix sericea* (Orians *et al.*, 1996), *Betula pendula* (Rousi *et al.*, 1993; Bryant and Julkunen-Tiitto, 1995) and *Betula resinifera* (Bryant and Julkunen-Tiitto, 1995). Although evolutionary resource hypotheses consider a phenotypic trade-off between growth and secondary metabolism due to a genetic or phenotypic cost of defense, no correlations were found, which could simply be explained by the different abilities to acquire carbon among the different genotypes growing in a competitive environment. Another reason of the failure of the resource allocation hypotheses

to explain these results is that they partially ignore the homeostatic nature of organisms and the genotype evolutive history (Hamilton *et al.*, 2001).

Evolutionary consequences of genotypic variability of responses to elevated CO₂

Variability of responses to elevated CO₂ among genotypes may have evolutionary consequences. If genotypes of a species vary in their response to elevated CO₂, and if the response is heritable, then natural selection could increase the frequency of those genotypes with higher fitness. Thus, the range of responses determines the evolutionary potential of different genotypes. Responses of plant phenolic compound concentrations as well as DM_{st}, [TNC_{st}] and [N_{st}] concentrations to elevated CO₂ varied among genotypes of *D. glomerata* and *B. erectus*. However, there were no significant genotype x CO₂ interactions for phenolic concentrations and thus the heritability of phenolics response was low (less than 10% in both species). This result would indicate that changing atmospheric CO₂ concentrations may not result in strong changes of the relative fitness of certain genotypes over others in terms of plant antiherbivore defense in the analyzed case. The only three studies on CBSC genotypic variation at elevated CO₂ show contradictory results. While Fajer *et al.* (1992) did not find genotype x CO₂ interaction in three terpenoids of *Plantago lanceolata*, significant interactions were found in condensed tannins of *Populus tremuloides* (Mansfield *et al.*, 1999) as well in total phenolic compounds and condensed tannins of *Lotus corniculatus* (Goverde *et al.*, 1999).

Several problems arise in the study of potential for evolutionary change under increasing atmospheric CO₂ concentrations. First, plant growing conditions seem to influence genotype x CO₂ interactions. Previous studies show variable results within perennial grasses. For instance, Steinger *et al.* (1997) found a genotype x CO₂ interaction in leaf length of 37 genotypes of *B. erectus* when growing in competition-free tubes but not when growing in multispecies communities. This species had genotypic variability in biomass CO₂ response when analyzing seven genotypes growing in a six-species community (Leadley and Stöcklin, 1996). Lüscher and Nösberger (1997) did not find genotypic variability in the biomass response to CO₂ of plants growing in a community for any of the several species they analyzed, including *D. glomerata*, although the responses at the species level were different. If genotypic variability in response to CO₂ could be influenced by plant competition (Steinger *et al.*, 1997), the lack of significant interactions between genotypes x CO₂ in phenolic compound concentrations in our study could reflect the influence of plant growing conditions on the variability of response to CO₂. More experiments closer to natural conditions including

intraspecific and interspecific competition are needed to elucidate actual CO₂ effects on plants and ecosystems.

Secondly, changes in genetic composition under elevated CO₂ within a population will be a balance among heritable responses of all phenotypical characters influencing fitness. Leaf chemical quality, such as concentrations of nitrogen and chemical defenses and fiber content, seems to be major issues in terms of plant-insect herbivore dynamics (Lincoln *et al.*, 1993). Decreases in N concentrations at elevated CO₂ have been related to increased herbivore consumption (Bezemer and Jones, 1998) while increases of phenolics would have the opposite effect (Coley, 1986). Although under elevated CO₂ no evolutionary consequences would be found for changes in phenolic compounds in *D. glomerata* and *B. erectus*, significant genotype x CO₂ interaction for leaf N concentrations on *D. glomerata* (Roumet *et al.*, 1999) could differentially affect plant consumption among genotypes and exert a selective pressure on this species.

A third problem in the study of CO₂ induced evolutionary change is the few number of genotypes analyzed and the way of selecting genotypes from nature, that could lead to an under-representation of genetic variability of natural populations. All these problems in studying genetic variability suggest that current available data of intraspecific variability in biomass and chemical defenses responses to elevated CO₂ seem to be far from sufficient to predict evolutionary consequences of increasing CO₂ for plant and ecosystems.

Acknowledgments

We are grateful to José Escarré for advice about statistical analyses, Gerard Laurent for his assistance during all the experiment and the staff of the physiological ecology group and from the CEFE experimental garden for the monoliths extraction and the management of glasshouses. We also thank Marc Estiarte for helpful comments on the manuscript. This research was supported by CICYT (grants CLI99-0479 and REN-2000-0278/CLI), the French Foreign Affairs Office within a Swiss-French collaborative research program and Carbueros Metalicos SA. E.C. stay at CEFE was supported by a European Science Foundation grant within the Plant adaptation program.

Capítol 2

2. Effects of community species diversity on the phenolic compound response to elevated [CO₂] in green leaves and litter of 17 mediterranean grasses

E. CASTELLS¹, J. ROY², J. PEÑUELAS¹, S. ARTESERO¹

¹Unitat d'Ecofisiologia CSIC-CREAF, CREAF (Centre de Recerca Ecològica i Aplicacions Forestals) Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain.

²CEFE (Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive) CNRS. 1919 Route de Mende. 34293 Montpellier Cedex 5. France.

2.1. Abstract

We studied the response of the concentration of total phenolics to elevated $[\text{CO}_2]$ among 17 Mediterranean species belonging to four functional groups (composites, legumes, annual grasses and perennial grasses) growing in a competing environment for light, water and nutrients in a multispecies community. We aimed to answer whether the species and functional groups had a variety of responses to elevated $[\text{CO}_2]$, and whether an increasing number of species and functional groups within the community affected such response. In order to study the potential effects of elevated $[\text{CO}_2]$ on decomposition we also analyzed phenolic concentrations in litter for all species.

Phenolics showed a variety of responses under elevated $[\text{CO}_2]$. While no significant changes were found for green leaves of any of the studied species or functional groups, phenolic concentrations in litter increased a 19.4 % overall the species under elevated $[\text{CO}_2]$. This increase was species specific and not related to functional groups. Community species diversity had no effect on the phenolics response of composites and annual grasses to increasing $[\text{CO}_2]$. Our results do not fit in the resource allocation hypotheses which predict increases in phenolics under an increasing C availability. The lack of phenolic compound changes under elevated $[\text{CO}_2]$ could be due to the variability of biomass responses among species which could mask changes in phenolic compound synthesis, and to the resource limitation in Mediterranean grasslands which could reduce the response of phenolic compound response to elevated $[\text{CO}_2]$ in both legumes and non-legumes species in a multispecies community. We conclude that species historical and environmental background seems of special relevance in order to make predictions of phenolic compound changes in plants growing in a changing environment.

2.2. Introduction

After more than two decades studying the effects of elevated $[\text{CO}_2]$ on vegetation, it is widely accepted that plant physiology will be directly affected by the increases of C availability (Körner, 2000). The most reported changes are increases of plant biomass (Kimball, 1983; Poorter *et al.*, 1996) and leaf total non-structural carbohydrates concentrations ([TNC]) (Farrar and Williams, 1991; Koricheva *et al.*, 1998), and decreases in leaf nitrogen concentration ([N]) (McGuire *et al.*, 1995; Koricheva *et al.*, 1998). Elevated $[\text{CO}_2]$ is also expected to increase carbon-based secondary compounds (CBSC), such as phenolics (Lavola *et al.*, 1998 and references reviewed in Peñuelas and Estiarte, 1998). The resource allocation hypotheses Carbon-Nutrient Balance and Growth-Differentiation Balance (Bryant *et al.*, 1983; Loomis, 1932; Herms and Mattson, 1992) predict increases in CBSC under elevated $[\text{CO}_2]$ due to an imbalance between C and N availability. Increases of C availability in plants growing at elevated $[\text{CO}_2]$ are expected to stimulate photosynthesis more than growth because a limitation of other resources. The resulting 'excess C' (TNC) would be partially allocated to CBSC (Bazzaz, 1990; Herms and Mattson, 1992; Peñuelas and Estiarte, 1998; Wolfe *et al.*, 1998). Increases of CBSC under elevated $[\text{CO}_2]$ could have ecological consequences, by changing the interactions between plants and their herbivores (Lincoln *et al.*, 1993; Lindroth, 1996) and plant litter decomposition (O'Neill and Norby, 1996). Since phenolic concentrations, specially condensed tannins, have been shown to be negatively related to litter decomposition (Palm and Sanchez, 1991; Northup *et al.*, 1995), an enrichment of $[\text{CO}_2]$ may slow decomposition and reduce soil N availability (Strain and Bazzaz, 1983). A recent meta-analysis conducted by Koricheva *et al.* (1998) reported a global increase of CBSC under elevated $[\text{CO}_2]$ although the variability of responses among species was very high, including increases, no changes or decreases of CBSC under elevated $[\text{CO}_2]$ (Peñuelas and Estiarte, 1998). Since this variability is partially explained by experimental conditions (Peñuelas and Estiarte, 1998) it seems necessary to study the response of CBSC to elevated $[\text{CO}_2]$ in plants competing for resources in order to make predictions for changes in natural conditions.

Although there is an increasing number of experiments conducted with plants growing in a community, it is still uncertain how plant populations will respond to elevated $[\text{CO}_2]$. A major expected effect of increasing $[\text{CO}_2]$ is an increase of competition for resources other than CO_2 by speeding up plant growth (Bazzaz and McConnaughay, 1992). This effect is expected to be stronger in communities with several plant functional types, since they can have different responses to elevated $[\text{CO}_2]$ and therefore different abilities for competition

(Lüscher *et al.*, 1996). For instance, regarding to plant productivity, N-fixing species (legumes) are generally expected to be more responsible under elevated [CO₂] compared to non-fixing species since they are not nitrogen limited (Díaz, 1995). Therefore, legumes would be more competitive in a CO₂-rich environment and may increase their presence in the community (Lüscher *et al.*, 1996). However, the responses of species and functional groups under elevated [CO₂] have been shown to depend on plant resource availability (Poorter *et al.*, 1996).

Regarding to the importance of natural conditions for phenolic compound response to elevated [CO₂], two main questions remain to be answered. First, how phenolic concentrations change in plants submitted to a long-term exposure to elevated [CO₂]. This question will be addressed in Chapter 3. Second, how variability of responses to elevated [CO₂] of species and functional groups within a community, as well as species diversity, will affect the phenolic response to elevated [CO₂]. Changes in phenolics among species or functional groups at elevated [CO₂] could have consequences in their ability to compete other species, since the relative increase of phenolics could be an advantage in their interactions with herbivores (Lincoln *et al.*, 1993). The effects of community species diversity on the phenolic response to elevated [CO₂] has only been tested by Hartley *et al.* (2000), who compared the phenolic compound production under elevated [CO₂] of four herbaceous species growing in a community with the same plants growing individually in pots. They found that the results from plants grown in pots did not predict the outcomes for plants growing in a more complex community. There are no studies, however, examining the response of phenolics under elevated [CO₂] from plants growing in different degrees of diversity including several plant functional types.

We here tested the species and functional type variability in the responses of phenolic concentrations in green leaves and litter under elevated [CO₂], and the effects of community species diversity on such response. We studied 17 Mediterranean species belonging to four functional groups (composites, legumes, annual grasses and perennial grasses) growing in competition for light, nutrients and water at ambient [CO₂] (350 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) and elevated [CO₂] (700 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) at several degrees of plant diversity (number of species and functional groups). We aimed to answer: i) whether species and functional groups had differential responses to increasing [CO₂], ii) whether community species diversity affected the response of phenolics at elevated [CO₂], and iii) whether litter from plants growing at elevated [CO₂] had different responses than green leaves which could affect litter decomposition.

2.3. Materials and methods

Various plant communities were established by transplanting one-week-old seedlings into intact soil monoliths (28 cm deep, 0.5 m²), which were excavated from an old-field at the CEFE-CNRS campus in Montpellier (43-38' N, 3-52' E) (France) and inserted in 150 L plastic coated containers. The soil was a clay loam with low levels of organic matter (1.8-2.5 %), pH 8.2, C 1.2 %, N 1.2 mg kg⁻¹ and P (Olsen) 13.1 mg kg⁻¹. Each type of plant community was planted in 8 soil monoliths with 2 in each of 4 climate-controlled greenhouses. Two of these greenhouses were run at typically 370 µmol CO₂ mol⁻¹ (390 during the 3 winter months) and two at typically 700 µmol CO₂ mol⁻¹ (750 during the 3 winter months). Temperature and saturation vapor pressure deficit were tracking closely outside conditions provided by an online micrometeorological station. Light intensity was 50 % of incident light and watering approximately matched outside precipitation. The global radiation inside the greenhouse ranged from 3 MJ m⁻² day⁻¹ (in November) to 7.5 MJ m⁻² day⁻¹ (in March). No fertilizer was ever added. More information on the greenhouses microclimate can be found in Nijs *et al.* (2000). Seedlings were planted in rows at a density of 700 plants per m². Distance between rows was 3.5 cm and between plants on a row 4 cm. Seventeen herbaceous species, typical of Mediterranean old-field ecosystems, were planted: 6 annual grasses (*Aegilops geniculata*, *Bromus madritensis*, *B. hordeaceus*, *B. lanceolatus*, *Hordeum murinum*, *Lolium rigidum*), 4 annual composites (*Centaurea solstitialis*, *Galactites tomentosa*, *Tyrimnus leucographus*, *Urospermum picroides*), 4 annual legumes (*Medicago minima*, *M. orbicularis*, *Trifolium scabrum*, *T. angustifolium*) and 3 perennial grasses (*Bromus erectus*, *Dactylis glomerata*, *Phleum pratense*). Plant communities of 6 or 12 species were built. Six species communities were composed of annual species: 6 grasses (6G) or 3 grasses and 3 composites (3GC) or 2 grasses 2 composites and 2 legumes (2GCL). Twelve species communities had either annual species: 4 grasses 4 composites and 4 legumes (4GCL) or a combination of annual and perennial species: 3 annual grasses, 3 annual composites, 3 annual legumes and 3 perennial grasses (3GCLGp). When the number of species of a given family in a given community type was less than the total number of species of that family, different species were used in the four monoliths of that community type in each CO₂ level. For example, the treatment 2GCL was represented by the following 4 communities: 1. *A. geniculata*, *B. madritensis*, *M. minima*, *T. scabrum*, *T. leucographus*, *U. picroides*; 2. *B. lanceolatus*, *L. rigidum*, *M. orbicularis*, *T. scabrum*, *C. solstitialis*, *G. tomentosa*; 3. *A. geniculata*, *B. lanceolatus*, *M. orbicularis*, *T.*

angustifolium, *G. tomentosa*, *U. picroides*; and 4. *B. hordeaceus*, *H. murinum*, *M. minima*, *T. angustifolium*, *C. solstitialis*, *T. leucographus*.

These treatments were part of a larger experimental design set up to test the impact of the complexity of plant communities on ecosystem processes. The experiment was run for 5 years. Initially, the seeds were collected in an old-field 15 km north of Montpellier. Subsequently, the seeds (caryopses) of a particular community were collected at the end of the previous season in the stand with the same composition, grown at the same CO₂ concentration, which ensured transfer of any change across generations via seed size or quality. Leaf samples were collected during the fifth year of the experiment. On May 18 1998, before the onset of reproduction in most species, green leaves were collected in the different communities. Leaves were collected randomly on several individuals within each community sampled, stored in a 0 °C freezer and subsequently dry-frozen. Similarly, senescent leaves (litter) were sampled at the time of each species senescence (litter) between end of June and August, depending on the species phenology.

Total phenolic concentrations were analyzed on 2 to 11 replicates per species by Folin-Ciocalteu method, improved by using a blank of polyvinylpyrrolidone (PVPP) (Marigo, 1973). PVPP removes phenolic substances from the solution and avoids overestimation of total phenolics due to non-phenolics Folin-Ciocalteu reactive substances. Gallic acid was used as standard to estimate concentrations of phenolics. Leaf nitrogen concentration ([N]) was determined using a Carbon-Hydrogen-Nitrogen analyzer (Carlo Erba instruments, model EA 1108, Milano, Italy).

The statistical design consisted of a split-plot arrangement as described by Filion *et al.* (2000): Phenolics = ct + CO₂ + Greenhouse(CO₂) + treatment B + CO₂ x treatment B + Greenhouse(CO₂) x treatment B + e, with CO₂ treatment as the main plot, and species, functional groups or material type as a subplots (treatment B) depending on the conducted analyses. The CO₂ treatment to each greenhouse was allocated at random. Split-plot analyses were conducted with the statistical analysis software Statgraphics (Manugistics, Inc., Rockville, USA).

2.4. Results

Phenolics in green leaves and litter

Phenolic concentrations at both ambient and elevated $[\text{CO}_2]$ in green leaves and litter were variable among the studied species and functional groups. Composites was the functional group with higher phenolic concentrations (Fig. 6) and within Composites, *Galactites tomentosa* and *Urospermum picroides* were the species with higher concentrations (Fig. 7-8). In average for all species and $[\text{CO}_2]$, litter phenolics were 10.9 % lower compared to green leaves but those changes were not statistically significant. However, trends varied among functional groups. Composites, annual grasses and perennial grasses had 19.5 %, 24.1 % and 25.1 % lower concentrations in litter compared to green leaves respectively although only differences in annual grasses were statistically significant ($p < 0.05$), while legumes had 26.6 % higher marginally significant phenolic concentrations in litter compared to green leaves ($p < 0.1$) (Fig. 6). Only the species *Urospermum picroides*, *Tyrimnus leucographus*, and *Bromus hordaceus* had significant differences in phenolic concentrations between green leaves and litter ($p < 0.05$).

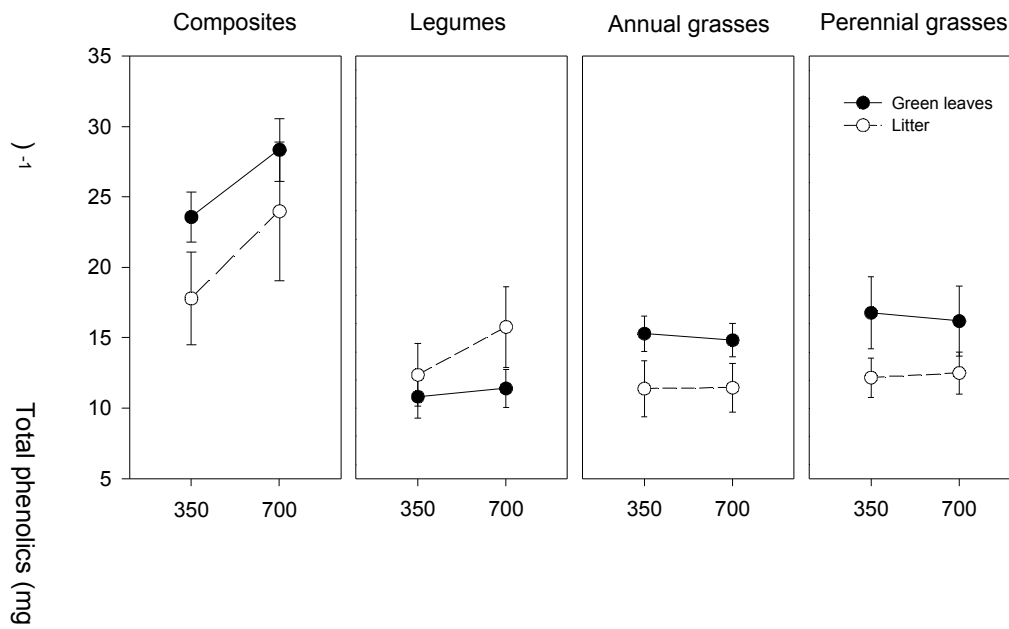


Figure 6. Average concentrations of total phenolics in green leaves and leaf litter of the four functional groups growing under ambient $[\text{CO}_2]$ ($350 \mu\text{mol mol}^{-1}$) and elevated $[\text{CO}_2]$ ($700 \mu\text{mol mol}^{-1}$). (See text for details). Values represent means and SE.

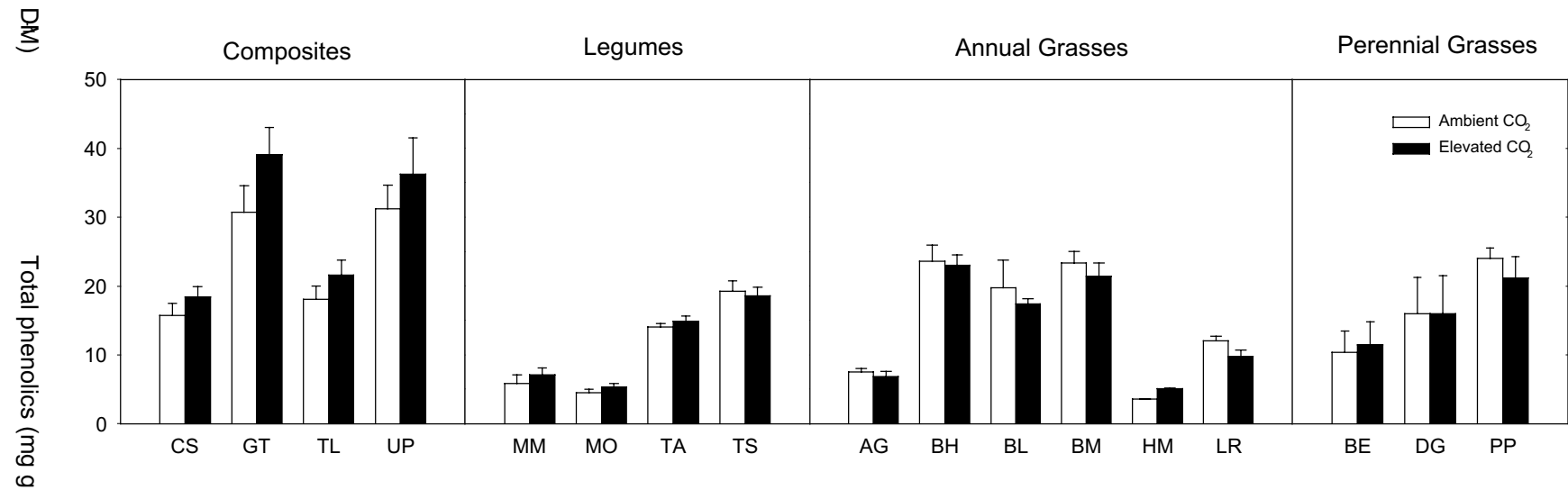


Figure 7. Total phenolic concentrations of green leaves of composites, legumes, annual grasses and perennial grasses growing at ambient [CO₂] and elevated [CO₂]. Values represent means and SE. (Abbreviations for composites: CS *Centaurea solstitialis*, GT *Galactites tomentosa*, TL *Tyrimnus leucographus*, UP *Urospermum picroides*. Abbreviations for legumes: MM *Medicago minima*, MO *Medicago orbicularis*, TA *Trifolium angustifolium*, TS *Trifolium scabrum*. Abbreviations for annual grasses: AG *Aegylops genticulata*, BH *Bromus hordeaceus*, BL *Bromus lanceolatus*, BM *Bromus madritiensis*, HM *Hordeum murinum*, LR: *Lolium rigidum*. Abbreviations for perennial grasses: BE *Bromus erectus*, DG *Dactylis glomerata*, PP *Phelum pratense*)

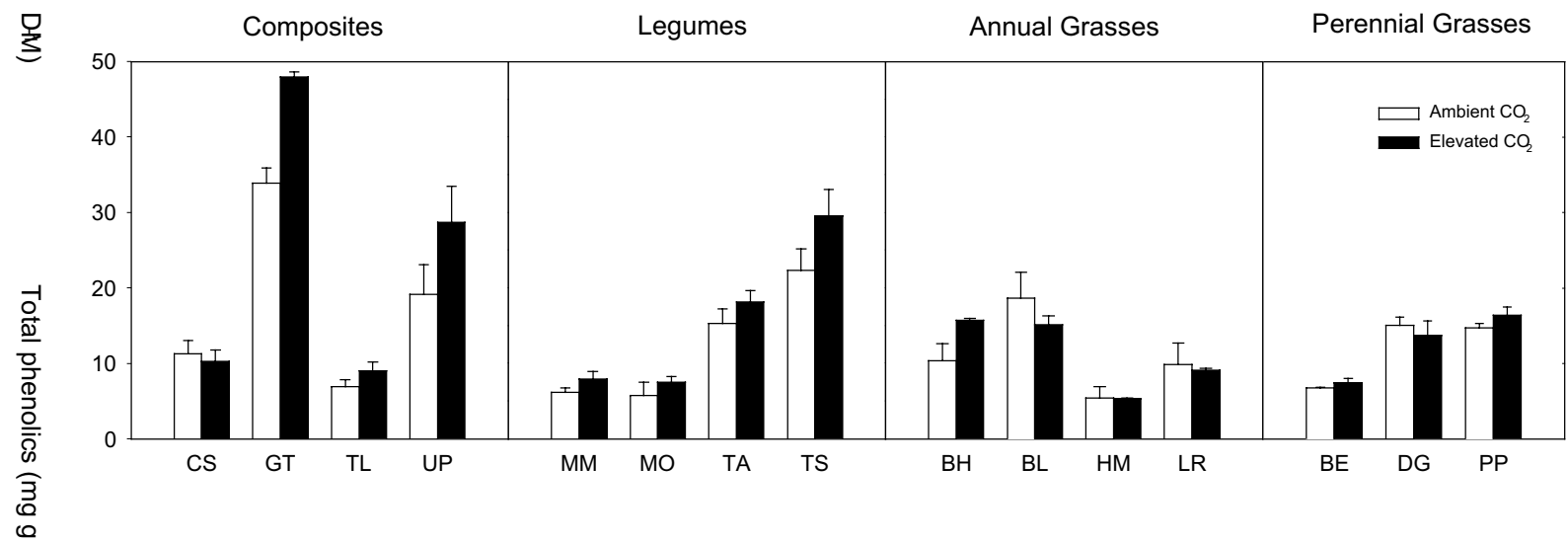


Figure 8. Total phenolic concentrations of litter from composites, legumes, annual grasses and perennial grasses growing at ambient [CO₂] and elevated [CO₂]. Abbreviations of the species names can be found in figure 7. Values represent means and SE.

	<i>Green leaves</i>	<i>Litter</i>
All data		
CO ₂	ns	0.069
Greenhouse (CO ₂)	ns	ns
Funct groups	0.009	0.011
CO ₂ x Funct groups	ns	ns
Greenhouse (CO ₂) x Funct groups	0.006	ns
CO ₂	ns	0.033
Greenhouse (CO ₂)	0.02	ns
Species	< 0.001	< 0.001
CO ₂ x Species	ns	0.013
Greenhouse (CO ₂) x Species	ns	ns
Composites		
CO ₂	ns	ns
Greenhouse (CO ₂)	ns	ns
Species	0.005	< 0.001
CO ₂ x Species	ns	ns
Greenhouse (CO ₂) x Species	0.026	ns
Legumes		
CO ₂	ns	ns
Greenhouse (CO ₂)	ns	ns
Species	< 0.001	< 0.001
CO ₂ x Species	ns	ns
Greenhouse (CO ₂) x Species	ns	ns
Annual Grasses		
CO ₂	ns	ns
Greenhouse (CO ₂)	ns	ns
Species	< 0.001	< 0.001
CO ₂ x Species	ns	ns
Greenhouse (CO ₂) x Species	ns	ns
Perennial Grasses		
CO ₂	ns	ns
Greenhouse (CO ₂)	0.024	ns
Species	0.008	0.041
CO ₂ x Species	ns	ns
Greenhouse (CO ₂) x Species	ns	ns

Table 5. Split-plot statistical results of total phenolics in green leaves and litter of 17 Mediterranean species growing at ambient [CO₂] and elevated [CO₂] and belonging to four functional groups (composites, legumes, annual grasses and perennial grasses).

Phenolic compound response to elevated [CO₂]

In green leaves, average concentrations for phenolics in all species changed from 17.4 mg g⁻¹ at ambient [CO₂] to 18.9 mg g⁻¹ at elevated [CO₂] (8.6 %) mainly due to increases in phenolics from composites (Fig. 7). However, increases of phenolic under elevated [CO₂] were not significant, probably due to the high variability between greenhouses in composites (Table 5). In litter, average phenolic concentrations for all species increased from 13.5 mg g⁻¹ at ambient [CO₂] to 16.1 mg g⁻¹ at elevated [CO₂] (19.4 %) and this increase was statistically significant (Fig. 8, Table 5). Phenolics in litter had a variable response to elevated [CO₂] among species

since a significant interaction was found between species and [CO₂]. Within functional groups increase of phenolics at elevated [CO₂] was not significant and *Galactites tomentosa* was the only species which increased its phenolic concentrations in response to elevated [CO₂] when looking at the litter data, or the green leaves and litter data together.

Response of phenolics at elevated [CO₂] was similar between green leaves and litter since no significant interactions were found for tissue type (green leaves or litter) and [CO₂] (data not shown). However, *Bromus lanceolatus* and *Bromus lanceolatus* had significant interactions between plant material x [CO₂].

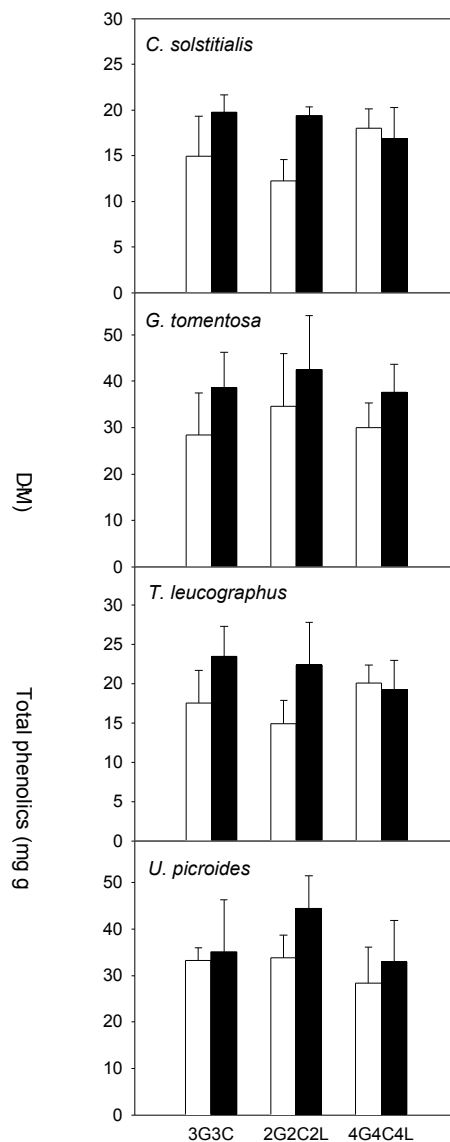


Figure 9. Total phenolic concentrations of 4 species of composites growing at ambient [CO₂] (open bars) and elevated [CO₂] (closed bars) and at three diversity treatments: 3G3C (3 species of annual grasses and 3 species of composites), 2G2C2L (2 species of annual grasses, 2 species of composites and 2 species of legumes) and 4G4C4L (4 species of annual grasses, 4 species of composites and 4 species of legumes). Values represent means and SE.

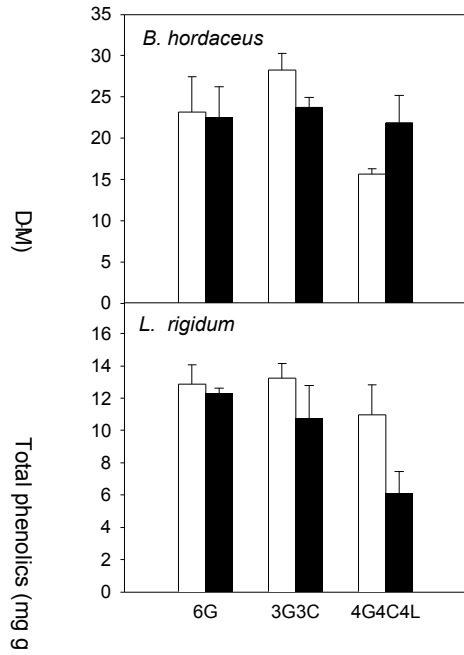


Figure 10. Total phenolic concentrations of 2 species of annual grasses growing at ambient [CO₂] (open bars) and elevated [CO₂] (closed bars) and at three diversity treatments: 6G (6 species of annual grasses), 3G3C (3 species of annual grasses and 3 species of composites) and 4G4C4L (4 species of annual grasses, 4 species of composites and 4 species of legumes). Values represent means and SE.

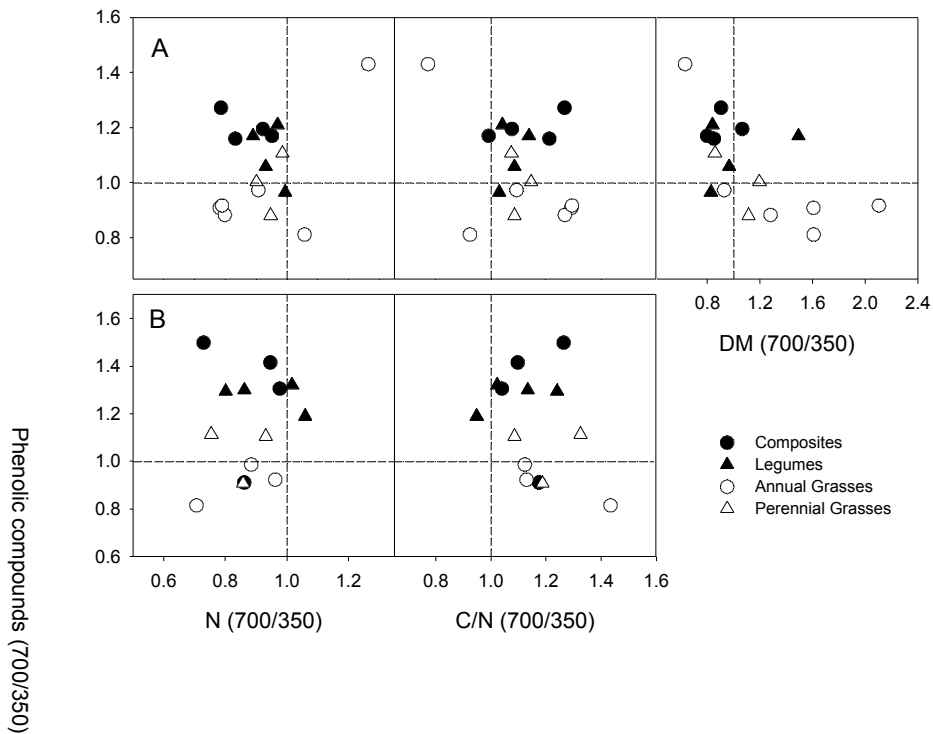


Figure 11. Relationships between increases of phenolic concentrations in response to elevated [CO₂] and increases in biomass, [N] or C/N ratio for composites, legumes and grasses green leaves (A) and litter (B). Each dot represent a species.

Effects of community species diversity treatments on the response of phenolics at elevated [CO₂]

Diversity treatments performed in four composites and two annual grasses had no effects on phenolic concentrations at ambient or elevated [CO₂] neither in the response of phenolics to elevated [CO₂] (Fig. 9-10). In annual grasses, phenolic concentrations at 4G4C4L were smaller compared to the other treatments independently to [CO₂] (Fig. 10).

	DM		[N]		C/N	
	Ambient CO ₂	Elevated CO ₂	Ambient CO ₂	Elevated CO ₂	Ambient CO ₂	Elevated CO ₂
<i>C. solstitialis</i>	0.11 ± 0.03	0.09 ± 0.02	1.18 ± 0.07	1.12 ± 0.06	34.96 ± 2.16	34.31 ± 1.71
<i>G. tomentosa</i>	0.42 ± 0.07	0.37 ± 0.05	0.94 ± 0.09	0.74 ± 0.04	45.49 ± 4.17	55.44 ± 3.53
<i>T. leucographus</i>	0.49 ± 0.08	0.52 ± 0.10	0.89 ± 0.06	0.82 ± 0.04	45.54 ± 2.92	48.13 ± 2.33
<i>U. picroides</i>	0.26 ± 0.06	0.22 ± 0.04	0.82 ± 0.07	0.68 ± 0.04	54.21 ± 4.46	63.96 ± 3.99
Composites	0.32 ± 0.04	0.31 ± 0.04	0.96 ± 0.04	0.84 ± 0.04	45.05 ± 2.03	50.26 ± 2.32
<i>M. minima</i>	0.28 ± 0.05	0.23 ± 0.05	2.53 ± 0.09	2.45 ± 0.06	16.46 ± 0.72	17.07 ± 0.41
<i>M. orbicularis</i>	0.19 ± 0.03	0.29 ± 0.09	2.54 ± 0.17	2.26 ± 0.16	17.14 ± 1.16	19.52 ± 1.43
<i>T. angustifolium</i>	0.41 ± 0.03	0.40 ± 0.10	2.07 ± 0.05	1.93 ± 0.08	20.49 ± 0.69	22.31 ± 0.99
<i>T. scabrum</i>	0.24 ± 0.07	0.20 ± 0.03	1.88 ± 0.12	1.86 ± 0.07	22.69 ± 1.62	23.15 ± 0.97
Legumes	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.04	2.26 ± 0.09	2.13 ± 0.07	19.11 ± 0.76	20.42 ± 0.74
<i>A. genticultata</i>	0.30 ± 0.06	0.49 ± 0.06	0.76 ± 0.04	0.59 ± 0.02	56.22 ± 3.59	70.95 ± 2.78
<i>B. hordaceus</i>	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.77 ± 0.04	0.70 ± 0.06	56.61 ± 3.50	63.87 ± 4.83
<i>B. lanceolatus</i>	0.10 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.86 ± 0.09	0.68 ± 0.11	49.51 ± 4.88	65.44 ± 8.70
<i>B. madritiensis</i>	0.10 ± 0.05	0.22 ± 0.09	0.70 ± 0.04	0.55 ± 0.02	61.16 ± 3.38	78.40 ± 2.93
<i>H. murinum</i>	0.24 ± 0.15	0.15 ± 0.06	0.61 ± 0.03	0.77 ± 0.11	68.46 ± 3.69	53.65 ± 7.13
<i>L. rigidum</i>	0.28 ± 0.05	0.45 ± 0.08	0.63 ± 0.02	0.66 ± 0.03	68.47 ± 1.97	64.10 ± 2.93
Annual Grasses	0.21 ± 0.03	0.29 ± 0.04	0.72 ± 0.02	0.65 ± 0.02	60.24 ± 1.66	67.02 ± 1.97
<i>B. erectus</i>	1.65 ± 0.05	1.41 ± 0.28	0.91 ± 0.09	0.90 ± 0.05	43.28 ± 3.21	46.24 ± 2.55
<i>D. glomerata</i>	0.93 ± 0.15	1.11 ± 0.33	0.87 ± 0.07	0.78 ± 0.04	45.98 ± 2.20	52.47 ± 2.55
<i>P. pratense</i>	0.52 ± 0.09	0.58 ± 0.08	0.81 ± 0.05	0.77 ± 0.06	53.16 ± 3.09	58.34 ± 5.15
Perennial Grasses	1.03 ± 0.15	1.03 ± 0.17	0.86 ± 0.04	0.82 ± 0.03	47.47 ± 1.96	52.35 ± 2.41

Table 6. Mean and SE of Dry mass (DM), nitrogen concentrations ([N]) and C/N ratio for green leaves of 4 species of Composites, 4 species of Legumes, 6 species of Annual Grasses and 3 species of Perennial Grasses growing at ambient [CO₂] and elevated [CO₂].

Relative increases in phenolics under elevated [CO₂] in green leaves and litter were accompanied by decreases in biomass (Fig. 11). Thus, those species with stronger increases in phenolic concentrations at elevated [CO₂] tended to have lower responses in biomass. No relationships were found for increases in phenolic concentrations under elevated [CO₂] and the decreases in [N] neither with increases of C/N ratio. Although average increase of phenolics concentrations was variable among species, most species had lower [N] and higher C/N ratio (Fig. 11, Table 6).

2.5. Discussion

Phenolic compound response to elevated [CO₂] in green leaves and litter of the different species and functional types

Phenolic compound concentrations had no clear responses to elevated [CO₂]. Despite an increase of the average phenolic concentrations in green leaves from composites under elevated [CO₂], statistical differences were not significant probably due to a high variability among greenhouses. Average concentrations in legumes, annual grasses and perennial grasses remained quantitatively similar between ambient and elevated [CO₂]. In litter, phenolic concentrations of overall species increased under elevated [CO₂], but this increase was species-specific. Thus, these results do not follow completely the predictions of resource allocation hypotheses (Bryant *et al.*, 1983; Loomis, 1932; Herms and Mattson, 1992) which predict increases in CBSC when plants are submitted to higher C-to-N availability. Moreover, changes in phenolic concentrations in response to elevated [CO₂] were not negatively related to changes in N concentrations as expected from these hypotheses. Although resource allocation hypotheses are supported by many experimental studies (Koricheva *et al.*, 1998), there are also many studies reporting absence of enhanced phenolic concentrations or even decreased phenolic concentrations under elevated [CO₂] (Peñuelas and Estiarte, 1998) especially when considered at the long-term in CO₂ spring studies (Peñuelas *et al.*, 2001). Several reasons can explain the variability of species response to elevated [CO₂]. First, the presence of different specific phenolics among species could affect their response to elevated [CO₂]. Condensed tannins and other phenylpropanoid compounds have shown a strong

response to elevated CO₂ whereas higher variability of responses have been shown for hydrolyzable tannins (Koricheva *et al.*, 1998; Peñuelas and Estiarte, 1998). Diversity in biomass response to elevated [CO₂] can also be an important source of CBSC variability since they mask changes in phenolic concentrations without changes in their synthesis. If biomass increases under elevated CO₂ are proportionally higher than increases in phenolic synthesis, phenolic concentrations will show a dilution effect leading to decreases in concentrations. This effect can be minimized by expressing CBSC concentrations in a structural dry weight basis (Peñuelas and Estiarte, 1998). Phenolics can also increase their concentrations without increases in their synthesis if biomass shows a decrease under elevated CO₂, that is when a concentration effect takes place. When we plotted phenolic compound contents *versus* phenolic concentrations (Koricheva, 1999), species showed a variety of responses. In composites, increases in phenolic concentrations depended on a concentration effect produced by biomass decreases at elevated [CO₂] in *Urospermum picroides* and *Centaurea solstitialis*, while *Tyrimnus leucographus* and *Galactites tomentosa* showed an excess synthesis of phenolics under elevated [CO₂]. Moreover, in annual grasses, four of the six studied species (*Bromus Madritiensis*, *Bromus lanceolatus*, *Lolium rigidum*, *Aegylops genticulata*) showed a decrease in phenolic concentrations together with increases in biomass, although phenolic compound contents, that is phenolic compound synthesis, was enhanced. Legumes and perennial grasses showed even a larger variability of responses, including a reduced synthesis (*Trifolium scabrum*, *Phelum pratense*), a concentration effect (*Medicago minima*, *Bromus erectus*, *Hordeum murimum*) or an increased synthesis of phenolics (*Medicago orbicularis* and *Trifolium angustifolium*). Thus, the use of concentrations for estimating differences in C allocation to CBSC under elevated [CO₂] would make difficult to test the resource allocation hypotheses when variability in biomass response tot elevated [CO₂] among species is high.

Another explanation for the lack of increases of phenolics under elevated [CO₂] can be the differences in plant ability to compete for nutrients in a environment with low nutrient availability, such as the experimental system used in our study. At low resource availability photosynthesis is highly constrained which could lead to a lack of increase of C assimilation under elevated [CO₂] despite of more C availability, which would determine no changes in phenolic concentrations (Herms and Mattson, 1992).

One of the ways to improve the prediction of changes in phenolic concentrations under elevated [CO₂] is looking for similar responses in those species sharing similar functional properties. The use of the functional groups in their response to elevated [CO₂] could be an important goal because it could allow to make predictions about responses of several species

(Díaz and Cabido, 1997; Grime, 1997). Although in our study concentrations of phenolics were clearly differentiated among functional groups at ambient [CO₂], they were not useful in order to explain the phenolic compound response at elevated [CO₂]. This response was more related to species level than general physiological characteristics of functional groups.

Effects of species diversity on phenolic compound response to elevated [CO₂]

The main aim of this study was to test the effects of community species diversity in the response of phenolic concentrations to elevated [CO₂]. Specifically, we wanted to answer whether such response was affected by: 1) an increasing number of species within the community, and 2) the presence of legumes within the community. Our data shows that non of the plant diversity treatments were relevant in the response of phenolics to elevated [CO₂] of 4 composites and 2 annual grasses. These species showed no change in phenolic concentrations at elevated [CO₂] when they were cultivated with 6 or 12 species or with absence and presence of composites or legumes. Diversity is expected to change plant response to elevated [CO₂] when the community are composed by species or functional groups with a variety of responses to elevated [CO₂], and thus different abilities for competition (Lüscher *et al.*, 1996). The absence of diversity effect found in our study could be due to the lack of variability of responses to elevated [CO₂] among species and functional groups, specially to the similar response of legumes compared to non-legumes. Presence of legumes could be specially determinant on the response of other species. Since legumes are not N-limited, they are expected to have a higher biomass response to elevated [CO₂] (Reich *et al.*, 2001; Niklaus *et al.*, 1998) and thus strongly outcompete other species. However, previous studies showed a high variability of responses. In some studies legumes had a higher biomass response under elevated [CO₂] compared to non-legumes (Lüscher *et al.*, 1996, 1998; Leadley *et al.*, 1999) but some of these responses were not consistent along time (Leadley *et al.*, 1999). Other studies found no differences among functional groups or even lower responses of legumes compared to non-legumes (Reich *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 1996; Stöcklin *et al.*, 1998). Since phenolic compound synthesis mainly depend on the balance between C and N availability, as explained by resource allocation hypotheses (Bryant *et al.*, 1983; Loomis, 1932; Herms and Mattson, 1992) it would be expected that legumes, with more N available compared to other functional groups, would allocate less C to CBSC. However, our results do not support this hypothesis since the 17 studied species and 4 functional groups had homogeneous responses on the phenolic concentrations under elevated [CO₂]. This similar response among species

could be explained by the low resource availability from the studied Mediterranean grassland other than CO₂, since low fertility ecosystems have shown only a marginal response to elevated [CO₂] (Mooney *et al.*, 1991; Poorter *et al.*, 1996). Under low nutrient conditions non-fixing grasses response to elevated [CO₂] can be limited by N availability (Zanetti *et al.*, 1997) while legumes may grow with inadequate N₂-fixing ability when a resource other than N, such as phosphorus, limits growth (Niklaus *et al.*, 1998). In such nutrient limiting conditions the lack of response to elevated CO₂ among species could also determine an absence of a community species diversity effect on plant physiology, as we found for the studied composites and annual grasses.

Effects of elevated [CO₂] on decomposition

It has been postulated that increasing atmospheric [CO₂] will reduce leaf litter quality by decreasing N content and increasing lignin, and that these changes would slow litter decomposition and decrease N availability (Strain and Bazzaz, 1983). Changes in decomposition could be determinant in the regulation of the amount of C that can be sequestered from the atmosphere into the vegetation (Norby *et al.*, 2001). Phenolic compound concentrations, specially condensed tannins, as well as the ratio N-to-phenolics have been proposed as predictors of litter decomposition and N immobilization (Fox *et al.*, 1990; Gallardo and Merino, 1992; Palm and Sanchez, 1991; Northup *et al.*, 1995). Thus, changes in phenolics in litter from plants growing at elevated [CO₂] are expected to affect decomposition (O'Neil and Norby, 1996). In our study, elevated [CO₂] increased phenolic concentrations in litter overall functional groups and species, but this response was species-specific. Our data indicate that enhanced atmospheric [CO₂] could have consequences in litter chemical composition and therefore on decomposition rates only in some species. However, caution is necessary when doing these predictions since other studies found no differences in senescent leaves under elevated [CO₂] (Peñuelas *et al.*, 1999). Moreover, a meta-analysis performed by Norby *et al.* (2001) do not support the hypothesis that changes in leaf litter chemistry associated with elevated [CO₂], including N and lignin, have an impact on decomposition process. In fact, [CO₂] effects on decomposition and nutrient cycling will be the result of a complex interaction of plant litter chemistry with other possible physiological and ecological changes linked to elevated [CO₂], such as changes in biomass allocation to different organs, changes in ecosystem structure and species composition or the direct effects of altered temperature and moisture (Peñuelas and Estiarte, 1998).

Final remarks

The several works carried until this moment suggest that species historical background is specially relevant in order to predict responses of secondary metabolites at elevated [CO₂] (Hamilton *et al.*, 2001). The resource allocation hypotheses Carbon-Nutrient Balance and Growth-Differentiation Balance (Bryant *et al.*, 1983; Loomis, 1932; Herms and Mattson, 1992) turned to be too simplistic in order to predict response of secondary metabolites of differences species growing in a complex environment. Caution is necessary when doing predictions of the impact of increasing atmospheric [CO₂] on biotic interactions and on decomposition mediated by phenolics since trends are not always clear and it is not known what degree of changes are required to affect ecological interactions. More studies on plants growing in natural conditions are necessary to improve the predictions of vegetation changes under elevated [CO₂].

Acknowledgements

E.C. has a predoctoral fellowship (FPI) from the Ministerio de Educacion y Cultura (Spain) in collaboration with Carbueros Metalicos SA. We thank financial support from CICYT grants CLI99-0479 and REN-2000-0278/CLI (Spanish Government), IMMFACTE grant (DURSI and DMA, Catalan Government) and Fundació Territori i Paisatge (Catalonia).