UNIVERSIDAD DE MURCIA

Escuela de Doctorado

TESIS DOCTORAL

Efecto de la composición de sustratos en la fisiología y la calidad de plantas de interés agronómico y medicinal.

AUTOR/A Nidia Edith Ortiz Delvasto

DIRECTOR/ES Micaela Carvajal Alcaraz
Gloria Bárzana González

2025

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Escuela de Doctorado

TESIS DOCTORAL

Efecto de la composición de sustratos en la fisiología y la calidad de plantas de interés agronómico y medicinal.

AUTOR/A Nidia Edith Ortiz Delvasto

DIRECTOR/ES Micaela Carvajal Alcaraz
Gloria Bárzana González

2025

UNIVERSIDAD DE MURCIA

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA EN MODALIDAD DE COMPENDIO O ARTÍCULOS PARA OBTENER EL TITULO DE DOCTOR/A

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19 de octubre de 2022.

Yo, Dª. Nidia Edith Ortiz Delvasto, habiendo cursado el Programa de Doctorado Biología Vegetal de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Murcia (EIDUM), como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a titulada:

Efecto de la composición de sustratos en la fisiología y la calidad de plantas de interés agronómico y medicinal.

y dirigida por:

Dª.: MICAELA CARVAJAL ALCARAZ
Dª.: GLORIA BÁRZANA GONZÁLEZ
Dª.: ANA MARIA ORTUÑO TÓMAS

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Además, al haber sido autorizada como prevé el artículo 29.8 del reglamento, cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Murcia, a 12 de mayo de 2025

(firma)

Firmante: NIDIA EDITH ORTIZ DELVASTO; Fecha-hora: 12/05/2025 20:01:02; Emisor del certificado: CN=AC FNMT Usuarios,OU=Ceres,O=FNMT-RCM,C=ES;

@dministración electrónica

Código seguro de verificación: RUxFMuRr-qhIt9s/M-oj6VNLDH-rPTiHkM+

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: https://sede.um.es/validador/

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados:	
Responsable	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

Firmante: NIDIA EDITH ORTIZ DELVASTO; Fecha-hora: 12/05/2025 20:01:02; Emisor del certificado: CN=AC FNMT Usuarios,OU=Ceres,O=FNMT-RCM,C=ES;

@dministración electrónica

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: https://sede.um.es/validador/

La presente Tesis Doctoral lleva por título “Efecto de la composición de sustratos en la fisiología y la calidad de plantas de interés agronómico y medicinal.”, se presenta como “Tesis tradicional con hasta dos publicaciones” de los siguientes artículos de investigación publicados con el acuerdo de los directores de Tesis Doctoral y el responsable de la Comisión Académica del programa de Doctorado en Biología Vegetal de la Universidad de Murcia:

Ortiz-Delvasto, N., Garcia-Gomez, P., Carvajal, M., & Bárzana, G. (2023). Aquaporins-mediated water availability in substrates for cannabis cultivation in relation to CBD yield. Plant and Soil, 0123456789. https://doi.org/10.1007/s11104-023-06341-8

Ortiz-Delvasto, N., & Carvajal, M. (2025). Elevated carbon dioxide and substrate composition affect growth, nutrient uptake, and water use efficiency in blueberry cultivation under greenhouse. Journal of Plant Nutrition. https://doi.org/10.1080/01904167.2025.2470388

Además de las publicaciones incluidas en la presente Tesis Doctoral, han derivado las siguientes publicaciones adicionales:

Revistas científicas:

Ortiz-Delvasto, N., Garcia-Ibañez, P., Olmos-Ruiz, R., Bárzana, G., & Carvajal, M. (2023). Substrate composition affects growth and physiological parameters of blueberry. Scientia Horticulturae, 308(3). https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111528

Alireza Solouki, Jose Ángel Berna-Sicilia, Alberto Martinez-Alonso, **Nidia Ortiz-Delvasto**, Gloria Bárzana, Micaela Carvajal (2023). Onion plants (Allium cepa L.) react differently to salinity levels according to the regulation of aquaporins. Heliyon, 9 (3). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13815.

Contribución para congresos nacionales e internacionales:

López-Zaplana Álvaro, García-Gómez Pablo, Olmos-Ruiz Rafael, **Ortiz-Delvasto Nidia**, Martínez Alonso Alberto, Bárzana Gloria, García-Ibáñez Paula, Carvajal- Alcaraz Micaela. (2022). Poster: Developmet of bio-nanomaterials as biostimulants of aquaporin genes. XVI Meeting of Plant Molecular Biology. Seville, España. https://www.bcongresos.com/congresos/gestor/ckfinder/userfiles/files/Abstract%20Bo ok%20XVI%20RBMP%20updated.pdf

Nidia Ortiz-Delvasto, Pablo García Gómez, Micaela Carvajal, Gloria Barzana, (2023). Poster: Substrate effect in Cannabis cultivation attending to the physiological development of the plants in relation to water availability. Congreso de Biología Vegetal, Braga, Portugal.

Nidia Ortiz-Delvasto, Pablo García Gómez, Micaela Carvajal, Gloria Barzana, (2024). Poster: Influence of Aquaporins on the availability of water from substrates for growing cannabis, as well as their impact on the CBD performance. XVII Congreso de Biotecnología, Murcia, España.

Nidia Ortiz-Delvasto, Paula Garcia-Ibañez, Rafael Olmos-Ruiz, Gloria Bárzana y Micaela Carvajal, (2024). Efecto de la composición del sustrato sobre el crecimiento y fisiología del arandano. Sociedad Española de ciencias/ Cartagena, España.

“No hay barrera, cerradura ni cerrojo que puedas impo-

ner a la libertad de mi mente”

(Virginia Woolf)

Agradecimientos

Agradecimientos

No sé por dónde empezar estos agradecimientos; son tantas las personas a las que debería dar las gracias hoy, que siento que no me alcanzarían las páginas para mencionarlas a todas. Cada una ha dejado su huella en este camino, y por eso les estoy profundamente agradecida. Este logro no sería lo mismo sin su apoyo, cariño y compañía.

Quisiera antes que nada expresar mi agradecimiento a Dios, por haberme dado fortaleza y consuelo a lo largo de este proceso. Su presencia fue mi refugio en los momentos más difíciles y mi guía cuando todo parecía incierto. A través de cada desafío, sentí su apoyo constante y su amor incondicional. Gracias por renovar mi esperanza y sostenerme cuando flaqueaban mis fuerzas. A Él encomiendo con humildad cada logro alcanzado.

Al CEBAS-CSIC, mi profundo agradecimiento por haber sido mucho más que una institución académica: fue mi hogar durante estos años. Allí encontré no solo un espacio de aprendizaje, sino también un entorno cálido y humano que me acogió y me impulsó a crecer. Fue el lugar donde mi vocación científica tomó forma, y donde cada día se convirtió en una oportunidad para avanzar. Gracias por cada experiencia compartida, por cada apoyo brindado y por permitirme ser parte de esta gran familia. Siempre llevaré al CEBAS en mi corazón.

Un agradecimiento muy especial a mi directora Micaela Carvajal, o Mica como todos en el grupo le decimos, gracias por tu guía constante y tu compromiso generoso. Tu sabiduría y empatía marcaron profundamente mi camino. Has sido una mentora en lo académico y un ejemplo en lo humano. Agradezco cada regaño que me enseñó a mejorar y cada celebración cuando una publicación era aceptada. Gracias también por escucharme más allá de lo profesional, por acompañarme en momentos de incertidumbre y por confiar en mí incluso cuando yo dudaba. Hoy puedo decir con orgullo que soy Doctora, y eso es en gran parte gracias a ti, por tu fe constante, tu exigencia con sentido y tu presencia cercana. Siempre estaré agradecida por tu confianza, por tu afecto y por haberme ayudado a alcanzar este sueño.

También quiero agradecer a Gloria, mi codirectora, gracias por tu minuciosa labor de revisión, por tus aportes tan contributivos, pero sobre todo por cada palabra de aliento. tu apoyo profesional y personal fueron esenciales en cada etapa de mi formación. Gracias por tu amistad sincera y duradera. Siempre dispuesta a ayudarme, de corazón gracias, por tanto.

Agradecer también a mi tutora, Ana María Ortuño, por su constante disposición, por nunca ponerme inconvenientes y, por el contrario, por siempre estar disponible para resolver cualquier duda o inquietud que surgiera en el camino.

Agradezco a mis compañeros y amigos Rafa, Pablo, Alberto y Celia, por su compañía en este camino complejo. Compartimos dudas, logros y aprendizajes, gracias por las risas compartidas en la oficina y por esos momentos de distensión tan necesarios. Las eternas conversaciones de la bibliotecaria fueron el fondo sonoro de muchas jornadas, y reír con vosotros las hizo mucho más llevaderas. Gracias por vuestra alegría y complicidad. Una mención especial a Alberto, pues contigo compartí largas jornadas de trabajo en la finca, que pusieron a prueba nuestra perseverancia y compromiso. Estoy convencida de que este proceso no hubiese sido tan gratificante si lo hubiesemos enfrentado solos. A Marga, gracias por preocuparse siempre que nos veía trabajar a pleno rayo de sol, por su cercanía y cuidado en los momentos más intensos. Guardaré con cariño esos recuerdos.

Quiero también agradecer al grupo AQP, Lucía, Juan, Paula, Mery y Lorena, gracias por compartir su experiencia y conocimiento. Cada uno me enseñó algo importante. Agradezco la colaboración y el ambiente de apoyo mutuo. Fue enriquecedor compartir con ustedes este espacio. Siempre los recordaré con aprecio.

Quiero agradecer a la empresa PROJAR por su generoso suministro de sustratos, los cuales han sido fundamentales para el desarrollo de esta investigación, su colaboración y apoyo han sido esenciales para la realización de este trabajo.

También quiero agradecer al Dr. Alberto Gómez, por su generoso acompañamiento durante mi proceso académico. Gracias por compartir su experiencia, su tiempo y su entusiasmo por la ciencia. Su ejemplo profesional me motivó a seguir creciendo. El es un guía sabio y siempre accesible.

Un agradecimiento especial al Jardín Botánico del Quindío, por abrirme sus puertas y permitirme realizar mi estancia. En ese espacio encontré inspiración, conocimiento y un entorno humano excepcional. La experiencia allí enriqueció mi formación de manera significativa. Agradezco el aprendizaje y el trato cálido recibido, esta etapa fue muy valiosa para mí.

También agradecer a José Salvador, por ser ese profe inspirador y un modelo a seguir. Su pasión por enseñar dejó una huella imborrable en mí. Sus clases me inspiraron y sus consejos me guiaron más allá del aula. Es un referente por su integridad y dedicación. Gracias por motivarme con su ejemplo constante.

Quiero agradecer especialmente a mi padre, cuya memoria me acompaña desde el cielo, gracias por sembrar en mí el amor por el estudio. Su fe en mis capacidades me ha impulsado hasta hoy. Lo llevo presente en cada logro, en cada paso firme. Su ejemplo de esfuerzo y nobleza me guía. Esta tesis también es tuya.

También agradecer a mi madre, por su amor incondicional y su apoyo permanente. Por estar a mi lado incluso en silencio, con su presencia serena. Gracias por comprender mis ausencias y por tu cariño inquebrantable. Tu fortaleza ha sido una inspiración constante. Esta meta es también fruto de tu entrega.

Quiero agradecer a mi esposo César y a mi hijo Kevin, gracias por su comprensión y su paciencia. Por acompañarme con amor en los días difíciles y celebrar los buenos momentos. Por aceptar mis largas jornadas, mis fines de semana ocupados y mis cambios de humor. Su apoyo incondicional fue esencial. Los amo profundamente.

Un infinito agradecimiento a mi hija Caroline, por su fe ciega en mí y su aliento constante. Gracias por recordarme quién soy cuando sentía que flaqueaba. Tu admiración me empujó a seguir adelante. Eres una fuente de alegría y esperanza. Gracias por ser mi inspiración diaria.

También quiero agradecer a Naty, por levantarme el ánimo en cada llamada, por saber estar siempre, incluso desde lejos. Tu energía me llegó cuando más la necesitaba. Gracias por tu cariño sincero y tu lealtad. Me ayudaste a mantenerme firme y animada. Tu amistad ha sido un regalo invaluable.

Quiero también agradecer a mi hermano, a Alex y Lesly, por esas tardes de café y cartas para despejar la mente y sobre todo por animarme a seguir adelante.

A todos, gracias por formar parte de este logro. Esta tesis se construyó con cada palabra, cada gesto, cada enseñanza recibida. Su huella permanece en estas páginas. Mi gratitud es profunda y permanente.

UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Memoria presentada para optar al título de Doctor por la Universidad de Murcia

Efecto de la composición de sustratos en la fisiología y la calidad de plantas de interés agronómico y medicinal.

Nidia Edith Ortiz Delvasto

Directora:
Dra. Micaela Carvajal Alcaraz
Dra. Gloria Bárzana González

Tutora:
Prof. Dra. Ana María Ortuño Tomás

Murcia, 2025

ÍNDICE

RESUMEN 5

ABSTRACT 11

INTRODUCCIÓN 17

1.1 CULTIVO SIN SUELO 17

1.2 NUTRICIÓN VEGETAL 20

1.3 RELACIONES HIDRICAS 25

1.4 CULTIVOS DE INTERÉS AGRÍCOLA E INTERÉS FARMACÉUTICO 28

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS 45

Justificación 45

Objetivos 47

Objetivo General 47

Objetivos Específicos 47

Capítulo I: Aquaporins-mediated water availability in substrates for cannabis cultivation in relation to CBD yield. 51

Capítulo II: Optimización del cultivo de arándano y cannabis en sustratos sin suelo: Efecto del tipo de sustrato sobre el desarrollo y la calidad. 71

Introducción 71

Materiales y métodos 72

Resultados 77

Discusión 88

Capítulo III: Elevated carbon dioxide and substrate composition affect growth, nutrient uptake, and water use efficiency in blueberry cultivation under greenhouse. 99

DISCUSIÓN GENERAL 123

3.1 Características físicas y químicas de los sustratos como factores fundamentales en el desarrollo y nutrición de las plantas 124

3.2 Las relaciones hídricas de la planta se ven influenciadas por la composición del sustrato. 132

3.3 La respuesta de los metabolitos secundarios 136

OBSERVACIONES FINALES 139

CONCLUSIONES 145

CONCLUSIONS 151

BIBLIOGRAFÍA 157

ABREVIATURAS

Abreviatura	English	Castellano
AQPs	Aquaporins	Acuaporinas
AW	Available Water	Agua disponible
BD	Bulk density	Densidad aparente
CBD	Cannabidiol	Cannabidiol
CBDA	Cannabidiolic acid	Ácido cannabidiólico
CBG	Cannabigerol	Cannabigerol
CBGA	Cannabigerolic acid	Ácido cannabigerólico
CE	Electrical Conductivity	Conductividad eléctrica
DW	Dry Weight	Peso seco
SD	Stomatal density	Densidad estomática
FW	Fresh weight	Peso fresco
gs	Stomatal Conductance	Conductancia estomática
NIP	Nodulin-26-like Intrinsic Proteins	Proteínas intrínsecas similares a nodulina26
NUE	Nitrogen Use Efficiency	Uso eficiente del Nitrógeno
PD	Particle density	Densidad de partícula
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria	Bacterias promotoras del crecimiento vegetal
PIP	Plasma Membrane Intrinsic Proteins	Proteínas intrínsecas de membrana plasmática
PSII	Photosystem II	Fotosistema II

RGR	Relative Growth Rate	Tasa de crecimiento relativo
RW	Reserve water	Agua de reserva
SD	Stomatal Density	Densidad estomática
SIP	Small Intrinsic Proteins	Proteínas intrínsecas básicas pequeñas
THC	Δ^9-tetrahidrocannabinol	Δ^9-tetrahidrocannabinol
THCA	Δ^9-tetrahydrocannabinolic acid	Δ^9-ácido tetrahidrocannabinólico
TIP	Tonoplast Intrinsic Proteins	Proteínas intrínsecas de tonoplasto
TPS	Total porosity space	Espacio poroso total
UAW	Unavailable water	Agua no disponible
WUE	Water Use Efficiency	Eficiencia en el uso del agua
XIP	X-Intrinsic Proteins	Proteínas intrínsecas X

RESUMEN

RESUMEN

Esta tesis doctoral abordó la problemática del estudio de la composición de sustratos para la producción especializada de cultivos de alto valor económico y farmacológico en cultivo sin suelo. Para ello, se estudió el desarrollo fisiológico y nutricional en relación a la calidad. La investigación se centró específicamente en dos especies de gran importancia: el arándano (*Vaccinium corymbosum L.*), ampliamente valorado por sus propiedades nutracéuticas, y el cannabis (*Cannabis sativa L.*), una planta de creciente interés para aplicaciones medicinales y terapéuticas. Ambos cultivos se estudiaron bajo condiciones ambientales controladas y en el caso del arándano, también, bajo enriquecimiento con dióxido de carbono (CO_2).

El estudio tuvo como objetivo principal determinar cómo diferentes composiciones de sustrato afectan el crecimiento, la fisiología, la absorción de nutrientes y la calidad. Se utilizaron combinaciones de fibra de coco, turba, perlita y chips de madera para evaluar su impacto sobre variables clave como la tasa de crecimiento relativo, la conductancia estomática, la densidad estomática, la eficiencia en el uso del agua (WUE) y la eficiencia en el uso del nitrógeno (NUE), entre otros indicadores.

En el caso del cannabis, la investigación reveló que los sustratos con mezclas como fibra de coco con turba (70/30) o fibra de coco con turba y perlita (60/30/10) fueron los más eficiente en promover el crecimiento vegetativo y la producción de biomasa total. Además, Las plantas cultivadas en estas mezclas presentaron una arquitectura más robusta, un sistema radicular más desarrollado y una absorción balanceada de elementos minerales como calcio, magnesio y hierro, favoreciendo la producción de metabolitos secundarios y mayor acumulación de biomasa.

En el caso del arándano, bajo condiciones de temperatura reguladas por un sistema de refrigeración que mantenía temperaturas de 25°C y 20°C (día/noche) y humedad, que se mantuvo estable entre el 60% y el 70%, se evidenció que el sustrato compuesto por fibra de coco (100%) fue el más favorable para el cultivo

de arándano. Este sustrato, no solo promovió un mayor crecimiento en altura y una tasa de crecimiento más rápida, sino que también facilitó la absorción de nutrientes esenciales, tales como nitrógeno, hierro, manganeso y zinc. Estas características fisiológicas y nutricionales reflejaron un entorno radicular óptimo para el desarrollo de la planta en términos de aireación, retención de agua útil y actividad microbiana.

Cuando se sometió el cultivo de arándano a condiciones de enriquecimiento con CO_2, los resultados indicaron que las combinaciones de sustrato con perlita (fibra de coco 90% + perlita 10%) y turba (fibra de coco 70% + turba 30%) superaron al sustrato de fibra de coco pura en cuanto a eficiencia fisiológica. En estos tratamientos se observó una mayor eficiencia en el uso del agua y del nitrógeno, así como una respuesta estomática más equilibrada. Esto sugiere que, bajo condiciones de enriquecimiento con CO_2, una mayor porosidad y estructura física adecuada en el sustrato facilita el manejo del equilibrio hídrico y de nutrientes, optimizando la respuesta fotosintética.

Los resultados permiten concluir que la elección del sustrato debe adaptarse a las condiciones ambientales y a los fines específicos del cultivo. Para el cannabis, la mezcla con turba ofrece una alternativa prometedora para mejorar la nutrición mineral y el rendimiento vegetal, mientras que, la fibra de coco pura es ideal en condiciones estándar para maximizar el desarrollo del arándano, sin embargo, combinaciones con perlita o turba se recomiendan para entornos enriquecidos con CO_2 donde se requiere un mayor control sobre la fisiología de la planta.

Este trabajo sienta las bases para futuras investigaciones orientadas al análisis molecular de los mecanismos fisiológicos implicados en la regulación del transporte de agua y nutrientes. Además, sugiere que una integración entre estrategias de manejo del sustrato, uso eficiente del agua y enriquecimiento con CO_2 podría representar un camino viable hacia una agricultura más precisa, productiva y de alta calidad.

ABSTRACT

ABSTRACT

This doctoral thesis investigated the challenges associated with optimising substrate composition for the specialised cultivation of high-value economic and pharmacological crops under soilless conditions. The study explored physiological and nutritional development in relation to quality outcomes. It focused specifically on two species of significant relevance: blueberry (*Vaccinium corymbosum L.*), renowned for its nutraceutical properties, and cannabis (*Cannabis sativa L.*), a plant of growing interest for medicinal and therapeutic applications. Both crops were cultivated under controlled environmental conditions, with blueberry additionally subjected to carbon dioxide (CO_2) supplementation.

The first objective of this study was to determine how varying substrate compositions influence plant growth, physiological performance, nutrient uptake, and product quality. Substrate mixtures composed of coconut fiber, peat, perlite, and wood chips were assessed for their effects on key variables such as relative growth rate, stomatal conductance, stomatal density, water use efficiency (WUE), and nitrogen use efficiency (NUE), among other physiological indicators.

In the case of cannabis, the research demonstrated that substrate mixtures such as coconut fiber and peat (70/30) or coconut fiber, peat, and perlite (60/30/10) were the most effective in promoting vegetative growth and total biomass accumulation. Plants cultivated in these substrates exhibited a more robust architecture, a well-developed root system, and a balanced uptake of mineral elements such as calcium, magnesium, and iron, thereby supporting the synthesis of secondary metabolites and enhancing overall biomass production.

For blueberries, grown under temperature-controlled conditions maintained at 25°C (day) and 20°C (night), and relative humidity stabilised between 60% and 70%, the substrate composed of 100% coconut fiber proved to be the most favourable. This medium not only enhanced plant height and growth

rate, but also facilitated the uptake of essential nutrients such as nitrogen, iron, manganese, and zinc. These physiological and nutritional traits indicated an optimal rhizosphere environment in terms of aeration, available water retention, and microbial activity.

Under CO_2 supplemented conditions, the blueberry crop showed improved physiological efficiency when grown in substrates incorporating either perlite (coconut fiber 90% + perlite 10%) or peat (coconut fiber 70% + peat 30%), outperforming the pure coconut fiber medium. These treatments resulted in increased WUE and NUE, along with a more balanced stomatal response, suggesting that, under CO_2 supplementation, greater substrate porosity and adequate physical structure facilitate the regulation of water and nutrient dynamics, thereby optimising photosynthetic efficiency.

The findings underscore the importance of adapting substrate selection to specific environmental conditions and cultivation objectives. For cannabis, peat-containing mixtures emerge as a promising option for enhancing mineral nutrition and plant productivity, while for blueberries, pure coconut fiber remains ideal under standard conditions. However, under CO_2 supplemented environments, combinations with perlite or peat are recommended to enable tighter physiological control.

This research lays the groundwork for future studies focusing on the molecular analysis of the physiological mechanisms governing water and nutrient transport. Furthermore, it suggests that an integrated approach combining substrate management strategies, efficient water use, and CO_2 supplementation could pave the way towards a more precise, productive, and high-quality form of agriculture.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1 CULTIVO SIN SUELO

El término “cultivo sin suelo” comprende cualquier sistema de cultivo que no utiliza suelo para la producción y desarrollo vegetal (Baixauli et al., 2002); inicialmente hacía referencia solo a cultivos en disolución nutritiva sin un medio de soporte como el suelo. Sin embargo, actualmente, incluye el cultivo de plantas con una disolución nutritiva y que utilizan soporte sólido (sustrato) para el anclaje (Fussy et al., 2022). Así, estos sistemas de cultivo se clasifican en sistema hidropónico (cultivo en agua con nutrientes) y sistema de cultivo en sustrato (cultivo sobre materiales químicamente activos, con capacidad de intercambio catiónico) (Abad et al., 2001).

La hidroponía, derivada de las palabras griegas "hidro" (agua) y "ponos" (trabajo), es un sistema de cultivo de plantas que prescinde del suelo y emplea sales minerales de los elementos esenciales para las plantas (Hosseinzadeh et al., 2017). También conocida como "agricultura de ambiente controlado" (CEA), esta técnica demanda la gestión precisa de variables ambientales como la luz, temperatura, humedad, pH del medio, y la disponibilidad de nutrientes minerales (Pandey, 2015). Dennis R. Hoagland y Daniel I. Arnon, de la Universidad de California, crearon diversas formulaciones de disoluciones de nutrientes minerales, tales como las disoluciones Hoagland y sus variantes modificadas, las cuales siguen siendo ampliamente utilizadas en la actualidad. Estas disoluciones fueron fundamentales para establecer los criterios de esencialidad de los elementos minerales (Marschner, 2012).

Por otro lado, el cultivo con sustrato, es un sistema de cultivo que un soporte para las raíces, tratándose de un “*medio solido distinto del suelo in situ, natural o de síntesis mineral u orgánico, que, colocado en un contenedor, permite el anclaje del sistema radicular, desempeñando un papel de soporte para la planta interviniendo activamente o no en el proceso de nutrición*” (Abad et al., 2005), además de aportar el oxígeno necesario para el funcionamiento correcto

del sistema radicular (Terés, 2001). Se considera uno de los sistemas más eficientes a nivel mundial, ya que se utilizan los recursos maximizando el rendimiento y la producción de cultivos (Albuja et al., 2021). La mayoría de los sustratos de cultivos sin suelo son medios porosos y granulares como la perlita o medios fibrosos como la fibra de coco. Estos actúan como reservorios de agua y minerales, además de servir como soporte mecánico para las plantas, pero con características físicas y químicas que pueden variar considerablemente. Teniendo en cuenta que la finalidad del sustrato de cultivo es producir una planta o un cultivo de calidad aumentando la producción en el período de tiempo más corto posible y con los menores costes de producción (Abad et al., 1993), deben formularse de manera que proporcionen las propiedades física y químicas adecuadas (Burnett et al., 2016). No obstante, se ha observado que las propiedades físicas de los sustratos cobran mayor relevancia respecto a las demás, dado que son fundamentales para asegurar la correcta nutrición de las plantas (Abad et al., 2002; Di Lonardo et al., 2021; Raviv et al., 1999). Atendiendo a estos parámetros, un sustrato de cultivo apropiado debe tener una serie de características como una buena capacidad de drenaje y amplios poros llenos de aire (Clark et al., 2020), pero también debe tener buena disponibilidad de agua (AW), con el fin de promover el desarrollo de las raíces y la absorción de nutrientes (Nemati et al., 2021). En este sentido, es importante resaltar que la disponibilidad del agua del sustrato, que relaciona el contenido de agua con el potencial mátrico (es decir, las fuerzas superficiales capilares y adsortivas que mantienen el agua bajo presión subatmosférica dentro de la matriz del sustrato), junto con la conductividad hidráulica, son las propiedades físicas más significativas que presiden los procesos de flujo, distribución de agua y aireación en sistemas con sustrato en contenedores.

En relación con las propiedades químicas (pH, conductividad eléctrica, capacidad de intercambio catiónico y disponibilidad de nutrientes, etc.), los sustratos orgánicos contribuyen en mayor grado a estas propiedades. Las propiedades químicas de un sustrato establecen la transferencia de materia entre el sustrato y la disolución, siendo de notable importancia en los materiales orgánicos (Cruz-Crespo et al., 2013).

Entre los sustratos actualmente utilizados, los que presentan las mejores condiciones físicas desde el punto de vista de la producción hortícola, son materiales orgánicos de origen natural (turba, fibra de coco, etc.) (Atzori et al., 2021). La turba es el material más utilizado en la producción hortícola. Su popularidad se debe a que es un material de bajo coste y sus excelentes propiedades químicas, biológicas y físicas, bajo pH, alta capacidad de retención de agua, gran espacio de aire y bajo peso (Fussy et al., 2022). Sin embargo, este es un recurso no renovable. Su explotación tiene impactos ambientales y ecológicos negativos, y, actualmente se encuentra catalogado como el medio de cultivo con mayor impacto en el cambio climático y los recursos (Machado et al., 2021), por lo que existe una tendencia a reducir los contenidos en turba de los sustratos.

También, los medios de cultivo a base de fibra de coco son sustratos utilizados frecuentemente para la producción de cultivos. La fibra de coco es una enmienda derivada del grueso mesocarpio o cáscara del fruto del coco (Cocos nucifera L.). La fibra de coco, como fibra corta (1–3 mm) y polvo de fibra de coco (<1 mm), resultan como material de desecho del proceso industrial de producción de fibras largas. En algunas ocasiones lleva un proceso de compostado de aproximadamente 6 meses, además de ser lavado y, a veces, tratado con nitrato de calcio (fibra de coco tamponada) con el fin de reducir su alto contenido en sodio (Na), cloruro (Cl) y potasio (K). Comercialmente, La fibra de coco se compone de aproximadamente un 75-80% de polvo de fibra de coco y un 20-25% de fibra corta (Abad et al., 2005). Entre los derivados de la fibra de coco se encuentran las virutas, que tienen una longitud de 5 a 15 mm y se emplean para mejorar la aireación del sustrato, por lo que se considera apto para la producción de cultivos sin suelo, tanto ornamentales como hortícolas (Stewart-Wade, 2020). Las características químicas y físicas de la fibra de coco pueden variar según su origen, ya que se produce en diversos países como Indonesia, India, Filipinas y Sri Lanka, desde donde se exporta principalmente a Europa. El polvo de fibra de coco se valora principalmente por sus propiedades físicas, que pueden ser variables, pero generalmente son óptimas para el cultivo sin suelo. Dichas propiedades están

influenciadas por el tamaño, distribución y homogeneidad de las partículas del polvo de coco (Atzori et al., 2021). Además, presenta alta capacidad de retención de agua, agua fácilmente disponible, alto contenido en lignina y menor contenido de celulosa que la turba, por lo que es más resistente a la degradación microbiana, también es fácilmente rehumectable, por lo que mejora la absorción de agua y la distribución del agua en el medio de cultivo (Machado et al., 2021).

Por otro lado, encontramos los sustratos inorgánicos, clasificados como materiales naturales no modificados (arena, toba y piedra pómez) o materiales procesados (lana de roca, arcilla expandida, perlita, y vermiculita), que se caracterizan por un alto grado de uniformidad (Papadopoulos et al., 2008). Actualmente la perlita es uno de los materiales más utilizados como mezcla para mejorar el drenaje y la estabilidad del medio (Kingston et al., 2020).

En general, diversas propiedades de un sustrato, tanto físicas como químicas, influyen en la retención, el movimiento y la disponibilidad de nutrientes minerales para el adecuado desarrollo de la planta. Sin embargo, a pesar de los conocimientos al respecto, aún no se han caracterizado las relaciones que existen entre los diversos tipos de sustrato y la capacidad de la planta para absorber el agua disponible y los nutrientes, además de la respuesta fisiológica según el cultivo.

1.2 NUTRICIÓN VEGETAL

1.2.1 Nutrición mineral de las plantas

La nutrición mineral hace referencia al suministro, la absorción y asimilación de compuestos químicos que requiere la planta para su metabolismo y desarrollo (Mengel et al., 2000).

En agricultura, el uso y aplicación de elementos minerales en el suelo con fines de mejora del crecimiento de las plantas y la producción se remonta a más de 2000 años (Bahadur et al., 2015). Sin embargo, solo hace 150 años que Justus

von Liebig (1803-1873) consiguió recopilar y resumir la información dispersa sobre la importancia de los elementos minerales para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Pandey, 2015). Estos logros llevaron a un rápido aumento en el uso de fertilizantes minerales en la agricultura. Posteriormente, diversos estudios en cultivo en suelo o medios sin suelo, como el cultivo hidropónico de plantas, condujeron a una mejor comprensión sobre la adquisición, acumulación, transporte y funciones de los elementos químicos en las plantas, además de caracterizar con mayor precisión la esencialidad de elementos minerales individuales y de su papel en el metabolismo (Sambo et al., 2019). El mantenimiento de las concentraciones óptimas de nutrientes dentro de la planta es esencial para su correcto crecimiento. Para completar su ciclo de desarrollo y alcanzar un crecimiento óptimo en términos de morfología y anatomía, la absorción de nutrientes debe ajustarse de manera precisa a las necesidades específicas de cada planta en cada momento de su desarrollo.

1.2.2 Nutrientes

Los nutrientes minerales además de ser esenciales para el metabolismo primario, son la base del metabolismo secundario, defensa, energía, respuesta hormonal e incluso regulación molecular de la planta, es por ello que deficiencias o excesos de algunos de ellos pueden ocasionar un efecto dramático en la fisiología de la planta (Walker, 2013). En este sentido, el contenido inadecuado (es decir, excesivo o deficiente) de nutrientes, además de la presencia de elementos tóxicos en los medios de cultivo, a menudo resultan en una disminución de la biomasa de las plantas, así como en una baja calidad de los cultivos (Marschner, 2012). Por lo tanto, en este sentido, las características químicas, como la carga superficial y el pH, y las propiedades físicas, como la textura y la estructura del suelo, son determinantes en la disponibilidad de nutrientes en la zona radicular (Kannan et al., 2022), lo que a su vez está estrechamente ligado al proceso de absorción de nutrientes por parte de las plantas. Este proceso radicular se ve afectado no solo por la disponibilidad de los nutrientes en el medio, es decir, por sus formas solubles (solubilización/precipitación), sino, también por las

formas químicas de los nutrientes presentes y por las interacciones entre diferentes nutrientes, como la competencia o el antagonismo (Sambo et al., 2019).

Las disoluciones hidropónicas contienen los nutrientes esenciales para el crecimiento de los cultivos, y, son absorbidas por las plantas en diversas formas iónicas, a través de una combinación de transporte activo y difusión por parte de las membranas de las células de las raíces (Son et al., 2019). Este aporte de nutrientes se realiza principalmente mediante fertilizantes, sales minerales, ácidos y bases y permite un mejor uso eficiente de insumos como agua y fertilizantes, lo que se traduce en mayores rendimientos. Cabe resaltar que las plantas crecidas en cultivo sin suelo, dependen de la aplicación directa de fertilizantes para su nutrición. Por lo tanto, la gestión precisa de la concentración de nutrientes es esencial y continúa siendo un factor determinante para el rendimiento y la calidad de los cultivos en sistemas sin suelo (Djidonou et al., 2019).

Tabla 1.1 *Forma de nutriente absorbido por la planta y su concentración promedio en la materia seca de los brotes necesaria para un crecimiento adecuado. Modificado de Fuente. (Pandey, 2015).*

Elemento	Abreviatura	Forma adoptada por las plantas.	Concentración en tejido seco.		No relativo. de átomos
			(ppm)	(%)	
Molibdeno	Mo	MoO_4^-	0.1	0.00001	1
Níquel	Ni	Ni^{2+}	~0.1	0.00001	1
Cobre	Cu	Cu^+, **Cu^{2+}**	6	0.0006	100
Zinc	Zn	Zn^{2+}	20	0.002	300
Manganeso	Mn	Mn^{2+}	50	0.005	1,000
Hierro	Fe	Fe^{3+}, **Fe^{2+}**	100	0.01	2,000
Boro	B	H_3BO_3	20	0.002	2,000
Cloro	Cl	Cl^-	100	0.01	3,000
Azufre	S	SO_4^{2-}	1,000	0.1	30,000
Fosforo	P	**$H_2PO_4^-$**, HPO_4^{2-}	2,000	0.2	60,000
Magnesio	Mg	Mg^{2+}	2,000	0.2	80,000
Calcio	Ca	Ca^{2+}	5,000	0.5	125,000
Potasio	K	K^+	10,000	1.0	250,000
Nitrógeno	N	**NO_3^-**, NH_4^+	15,000	1.5	1,000,000
Oxígeno	O	O_2, H_2O	450,000	45.0	30,000,000
Carbono	C	CO_2	450,000	45.0	35,000,000
Hidrógeno	H	H_2O	60,000	6.0	60,000,000

Atendiendo a la nutrición de las plantas, es importante resaltar el carbono (C) y el nitrógeno (N) por ser dos de los elementos que se requieren en mayores

cantidades por ser cruciales para actividades celulares rutinarias y fundamentales de las plantas (Zheng, 2009).

1.2.3 La importancia de las formas nitrogenadas

El nitrógeno (N) es un nutriente primario y esencial que afecta el crecimiento de las plantas y la producción agrícola, siendo el segundo elemento más requerido después del carbono. Es constituyente de proteínas, ácidos nucleicos, clorofila, coenzimas, fitohormonas y metabolitos secundarios y, representa entre el 1% y el 5% de la materia seca total de las plantas (Hawkesford et al., 2011).

Muchas especies de plantas superiores adquieren su N en forma de nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) de la solución del suelo. Sin embargo, la contribución de cada forma de N puede variar según las condiciones ambientales y las especies de plantas. Metabólicamente, la asimilación del amonio es menos costosa que la del nitrato, pero una alimentación exclusiva con amonio puede causar toxicidad en plantas o inhibir la absorción de nitrato (Marschner, 2012). Así, por ejemplo, en tomate las concentraciones de NH_4^+ /NO_3^- (75:25% y 100:0%) fueron toxicas para la planta (Ferreira Barreto et al., 2018), mientras que en plantas de cannabis, la producción de metabolitos secundarios, el rendimiento de la inflorescencia, la altura de la planta, la longitud de la inflorescencia, las tasas de transpiración y la fotosíntesis fueron más altos con la nutrición de NO_3^- en ausencia de NH_4^+, aunque la combinación con un 10% de NH_4^+ puede ser tolerada para el cultivo de cannabis medicinal, ya que no daña la función de la planta y no influye drásticamente en el rendimiento y la producción de cannabinoides (Saloner et al., 2022).

Sin embargo, se ha demostrado que el efecto combinado de amonio y nitrato es necesario o incluso beneficioso para muchas plantas, mejorando su crecimiento e indicadores relacionados con la biomasa, el desarrollo y la acumulación de materia seca (Chen et al., 2024). Por ejemplo, en arroz, una proporción 3:1 de NH_4^+ /NO_3^- mejora la absorción y translocación de nutrientes

y aumenta el crecimiento de las plántulas (Fu et al., 2023); en pimiento, la relación adecuada de NH_4^+ /NO_3^- fue 1:3, estimulando el desarrollo de las raíces, promoviendo las actividades enzimáticas y mejorando la productividad y la calidad de la fruta (Zhang et al., 2019); en col china, la proporción de 1:3 también mejoró la absorción y asimilación de N (Zhu et al., 2021); en trigo, la combinación 7.5mM NH_4^+ / 1mM NO_3^- estimuló el crecimiento de la raíz y el contenido de proteína (Du et al., 2019). Por lo tanto, la relación óptima entre NH_4^+ /NO_3^- puede variar según la especie y las condiciones ambientales.

1.2.4 El impacto de elevadas concentraciones de CO_2

Existe un creciente interés por entender el cambio climático global y su influencia en la dinámica del ciclo de carbono en las plantas. Este cambio, se debe principalmente a la acumulación de altas concentraciones de dióxido de carbono (CO_2), que como consecuencia de la actividad humana ha aumentado un 30% en la atmósfera (283 ppm en el siglo XIX al nivel medio mundial de 418 ppm en 2022) (Elbasiouny et al., 2022), y, a medida que la tasa de emisión de CO_2 continúa en todo el mundo, se espera un aumento de 140 ppm a mediados de siglo, que probablemente llegará a 1000 ppm en 2100 (Lobo et al., 2022). Esta alteración del equilibrio en la concentración de CO_2 es uno de los factores que conducen al cambio climático y el calentamiento global, los cuales afectan profundamente el ecosistema y los procesos naturales que sostienen la vida en la Tierra. Como consecuencia del desequilibrio terrestre encontramos cambios en los patrones climáticos, aumento del nivel del mar, el derretimiento de los casquetes polares, la extinción de especies y modificaciones en la disponibilidad de recursos hídricos. Además, estos efectos representan una amenaza significativa para el bienestar humano, afectando la seguridad alimentaria, la salud y la estabilidad económica (Nunes, 2023).

Así mismo, el incremento de CO_2 afectará al crecimiento y el desarrollo de las plantas a muchos niveles, tanto directamente, por el propio aumento de CO_2 disponible, como indirectamente, desafiando la capacidad de las plantas para adaptarse a las alteraciones climáticas, implicando todo ello un riesgo en la

seguridad alimentaria, así como en la calidad de los alimentos. Por ello, diversas investigaciones se han realizado a lo largo de los años en un intento de comprender cómo las plantas lidiarán con el incremento del CO_2. Estos estudios se han realizado de forma aislada o combinado con otros estreses abióticos (Bishop et al., 2014; Sial et al., 2022; van der Kooi et al., 2016; Yang et al., 2022) abordado el impacto del aumento de los niveles de CO_2 en el crecimiento de los cultivos, revelando que el aumento del CO_2 en pequeñas proporciones estimula la tasa fotosintética, aumenta el rendimiento de los cultivos y reduce la tasa de transpiración (Han et al., 2022; Liu et al., 2019; Sial et al., 2022). Los resultados de estas investigaciones han hecho que el enriquecimiento con CO_2 sea una técnica ampliamente aceptada para mejorar la fotosíntesis, aumentando así el rendimiento y los ingresos comerciales (Curtis et al., 1998; Jacotot et al., 2018; Pan et al., 2019) y, además, se ha aplicado en la agricultura comercial utilizando diversos métodos de enriquecimiento de CO_2 incluidos invernaderos, cámaras de crecimiento y túneles de gradiente (Wang et al., 2022). Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones se centran en la tasa de crecimiento de los cultivos anuales, lo que deja un vacío en el conocimiento que involucra a las plantas leñosas, especialmente en la integración de la nutrición y la fisiología.

Tampoco hay que menospreciar el hecho de que, si los niveles de CO_2 alcanzan niveles aún mayores, o son prolongados en el tiempo, ese crecimiento inicial por estimulación se ve drásticamente reducido, generando una aclimatación fotosintética que podría causar un desequilibrio en la nutrición y la calidad de la planta (Gojon et al., 2023), por lo que estudios detallados sobre los niveles aceptables de CO_2 para cada tipo de planta son necesarios para utilizar este tipo de técnicas sin perjudicar la producción y el medio ambiente.

1.3 RELACIONES HIDRICAS

El agua es el mayor constituyente de las plantas con más del 50% del peso fresco en plantas leñosas y más del 70% en plantas no leñosas, e interviene en casi todos los procesos fisiológicos desde el transporte de nutrientes hasta la fotosíntesis, además de participar en la regulación térmica, siendo elemento

fundamental para el desarrollo y crecimiento de las plantas. Gestionar eficientemente el agua es esencial para la planta, tanto para mantener su metabolismo en condiciones normales, como para adaptarse y afrontar situaciones de estrés. La respuesta de las plantas a estreses abióticos se fundamenta primordialmente en mecanismos que se encuentran relacionados con la gestión del agua tal como se ha mencionado anteriormente. Por ello, comprender las relaciones hídricas en la planta es fundamental para el desarrollo y crecimiento.

1.3.1 Absorción y transporte del agua en las plantas y su relación con los nutrientes y el metabolismo secundario

Cuando la disponibilidad de agua disminuye, los gradientes hídricos y la presión del contenido celular (turgencia celular) dentro de las plantas también se ven afectados. Esta pérdida de la turgencia ocurre cuando la pérdida de agua por transpiración supera la capacidad de absorción del agua del suelo, causando el marchitamiento y perturbando negativamente a la fotosíntesis. Igualmente, el balance hídrico influye en la apertura y cierre de los estomas, pequeños poros en las hojas que regulan el intercambio gaseoso y la transpiración (Scharwies et al., 2019). Asimismo, para que las plantas se adapten y puedan mantener un equilibrio entre la pérdida y la absorción de agua, estas emplean diversos mecanismos como la regulación de la apertura estomática, el ajuste de las conductividades hidráulicas de los tejidos, la osmorregulación y respuestas de desarrollo específicas (Sade et al., 2015). Estos procesos permiten a las plantas aclimatarse a su entorno y optimizar el uso de los recursos hídricos disponibles.

Cabe resaltar que, la relación entre la absorción de nutrientes minerales y el estado hídrico de la planta es estrecha. La absorción y distribución de nutrientes en las plantas está estrechamente vinculada al movimiento del agua. En este contexto, el flujo de agua a través de los diferentes tejidos vegetales constituye un componente determinante en la capacidad de la planta para redistribuir dichos nutrientes de unas partes a otras a través de las distintas vías de transporte. Dentro de estas vías está la vía apoplástica, en la que el agua es movida a favor del gradiente de presión generado por la transpiración a través de las paredes y los

espacios intercelulares. Esta vía tiene poca resistencia, pero no ejerce control sobre los compuestos transportados, por lo que las plantas combinan este tipo de movilización del agua con la otra vía de transporte, la vía simplástica, que incluye el atravesar una o varias membranas plasmáticas, obligando así al flujo de agua y los nutrientes contenidos en ella a atravesar estas membranas de forma controlada a través de canales y transportadores regulados (Steudle, 2000). Así, tanto el agua como los iones son incorporados al espacio intracelular a través de transportadores específicos de membrana (canales o transportadores específicos de los distintos elementos y las acuaporinas (AQPs)). La regulación de este transporte está directamente vinculada a la homeostasis celular (Steudle et al., 1998).

Por lo tanto, para comprender los mecanismos a través de los cuales las plantas son capaces de controlar su estatus hídrico es necesario estudiar las acuaporinas (AQP), que son proteínas de membrana directamente involucradas en el transporte de agua y nutrientes a través de las membranas plasmáticas.

1.3.2 Acuaporinas

Las AQPs son canales moleculares selectivos de membrana muy conservados a lo largo de la evolución que intervienen en el transporte específico de agua, pequeños solutos y iones, participan en procesos muy importantes como la expansión celular, la apertura y cierre estomático, la transferencia de señales a larga distancia, el desarrollo de las semillas y el polen y la tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico (Barzana et al., 2021).

En las plantas existe una gran diversidad molecular de acuaporinas. Hasta la fecha, se han identificado cinco subfamilias en plantas superiores: proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIP), proteínas intrínsecas de tonoplasto (TIP), proteínas intrínsecas similares a nodulina26 (NIP), proteínas intrínsecas básicas pequeñas (SIP) y proteínas intrínsecas X (XIP) (Verdoucq et al., 2018). Debido a su capacidad para transportar pequeños solutos no cargados, incluidos elementos minerales, las acuaporinas juegan un papel importante en la absorción y transporte de nutrientes en la planta (Lopez-Zaplana et al., 2024).

Entre los diversos tipos de acuaporinas, los grupos PIPs1 y PIPs2 realizan un papel importante en el transporte del agua en la membrana plasmática, encargándose del transporte de agua bidireccional hacia dentro y hacia fuera de las células, en función del gradiente osmótico (Madeira et al., 2016). En consecuencia, se encuentra involucrados en todos los procesos fisiológicos esenciales para la supervivencia de las plantas además de la respuesta frente a estreses (Yepes-Molina et al., 2020). También, en general, la sobreexpresión de PIP1 y PIP2 mejora el crecimiento y desarrollo de raíces, tallos y hojas (Leng et al., 2021). Además, estas acuaporinas se encuentran involucradas en el desarrollo de órganos reproductivos como la floración, la formación de frutos y semillas (Chen et al., 2022; Yang et al., 2022).

1.4 CULTIVOS DE INTERÉS AGRÍCOLA E INTERÉS FARMACÉUTICO

1.4.1 Vaccinnieae (Ericaceae): origen y evolución.

Perteneciente a la familia Ericaceae, *Vaccinnieae* es una extensa tribu que comprende alrededor de 35 géneros y aproximadamente 1430 especies, compuestas por arbustos terrestres o epífitos, e incluso pequeños árboles. Estas plantas, al igual que otros grupos de Ericaceae, prefieren suelos ácidos y, en las regiones tropicales, habitan principalmente en zonas montañosas. Entre las sinapomorfías características de *Vaccinnieae* se encuentran el ovario inferior y la presencia de túbulos de anteras. Este grupo es especialmente conocido por los cultivos del género Vaccinium (Becker et al., 2024; Stevens et al., 2004).

1.4.1.1 Arándano (Vaccinium spp)

Las especies *Vaccinium* comprenden un género morfológicamente diverso de 4250 especies (33 tipos), divididas en 9 subfamilias y 125 géneros prevalentes en Europa, el sudeste y centro de África, Asia y América del Norte y Central (Martău et al., 2023). Dentro de estas especies se destaca *V. corymbosum L.*

(Figura 1.1), un cultivo poliploide altamente heterocigótico y uno de los principales cultivos de frutas de Vaccinium cultivados en el siglo XX, el cual representa aproximadamente el 80% del total de la superficie cultivada en el mundo (Correia et al., 2024). El arándano es originario del hemisferio norte, entre el sur de Canadá y el norte de los Estados unidos, existiendo una amplia diversidad de variedades. Dependiendo de su origen, estas pueden clasificarse como arándanos alto del norte y arándanos alto del sur, clasificación que proviene del requerimiento de frío invernal y tolerancia a bajas temperaturas (Manzanero et al., 2023).

Figura 1.1 *Representación típica botánica del género Vaccinium. Ilustración botánica del arándano (Vaccinium spp.), donde se puede observar su aspecto general (1), detalle del tallo (2), hoja ovalada (3), ramilla con flor (4), flor (5), sección longitudinal de la flor (6). Estambres (7 y 8), fruto (9), semilla (10), sección trasversal del fruto (11). Ilustración de Castroviejo (1993). Esquema floral basado en Flora ibérica vol. IV. Real Jardín Botánico, CSIC.*

1.4.1.2 Vaccinium Corymbosum L. (Arándano Alto)

El arándano alto (*Vaccinium corymbosum L.*) es un arbusto monoico, de hoja caduca y de crecimiento lento, con diversos tallos que surgen del tronco y con una altura máxima de 3,5 m. Las hojas son glaucas, simples, enteras, elípticas a elíptico-lanceoladas, con ápice agudo y base cuneiforme. Las flores son bisexuales, en forma de campana, generalmente blancas o rosa pálido y se presentan en racimos terminales o axilares. Brácteas caducas, lóbulos del cáliz deltoides-ovalados, corola urceolada, generalmente blanca. El fruto es una baya glauca, de color verde pálido que se torna azul oscuro, púrpura a negro al madurar.

Figura 1.2. *Representación botánica del arándano (Vaccinium spp.), donde se puede observar sus hojas ovaladas (1), el fruto (2), su flor en forma pendular (3). Esquema floral basado en (Masclef, 1891).*

1.4.1.3 Vaccinium Corymbosum L.: Variedad Legacy

Genéticamente, esta variedad pertenece al grupo varietal de los arándanos de arbusto alto del sur, que se característica por su bajo requerimiento de frío invernal, oscilando entre las 500 y 600 horas, además de tolerante a condiciones de mayor temperatura y mantener sus hojas siempre verdes en invierno (Becerra et al., 2017).

1.4.1.4 Vaccinium Corymbosum L.: Importancia del arándano

El arándano es una especie de reciente incorporación a la fruticultura mundial, ha experimentado un notable crecimiento. Este cultivo, típico de regiones frías y húmedas del hemisferio norte, tiene su origen en América del Norte. En los últimos años, el rápido desarrollo de nuevas variedades, junto con su relevancia biológica, ha despertado el interés de numerosos países por establecer plantaciones, fomentando tanto su consumo como la expansión de su área de cultivo.

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en 2019 la producción mundial de arándanos alcanzó las 823.328 toneladas, distribuidas en más de 119.472 hectáreas sembradas. Estados Unidos y Canadá lideran la producción global, representando el 60% del total con 308.760 y 176.127 toneladas respectivamente. En la actualidad, España ocupa el primer puesto en el ranking de productores de arándanos en la Unión Europea alcanzando una producción de 70.000 toneladas en 2022 (Tinoco-Plasencia et al., 2023).

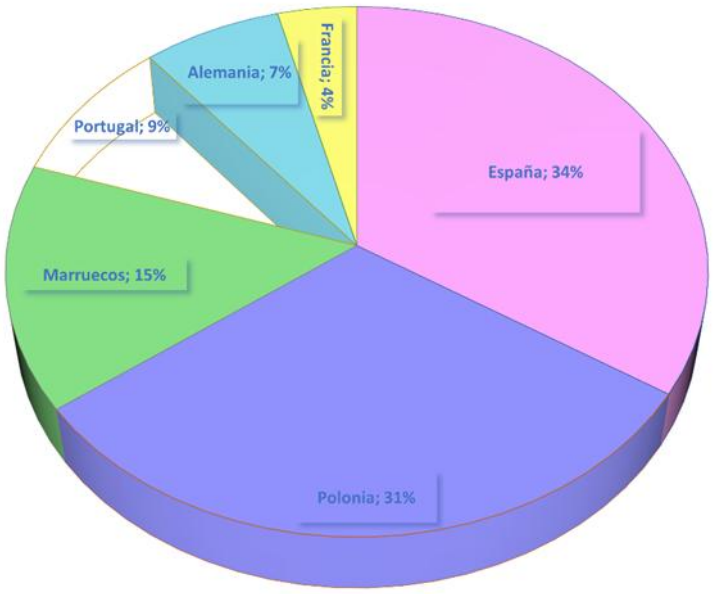


Figura 1.3. *Producción del cultivo de arándanos en los países de Europa con mayor producción en porcentaje a lo largo de cinco años. FAOSTAT (2024) Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). FAOSTAT Database.* https://www.fao.org/faostat/es/#compare-

Además de lo anterior, el arándano también es rico en numerosos compuestos bioactivos, denominados así debido a que son metabolitos resultantes del metabolismo secundario de las plantas y que presentan bioactividad. Entre estos metabolitos destacan compuestos bioactivos como flavonas y compuestos polifenólicos, que les otorgan fuertes propiedades antioxidantes, lo que los convierte en un alimento funcional beneficioso para la salud. Las antocianinas, la subclase más importante de flavonoides y la mayor parte de los compuestos fenólicos totales, se encuentran ampliamente en frutas y verduras a nivel mundial (Yang et al., 2022). Las especies de arándanos son bien conocidas por ser una buena fuente de antocianinas. Estas son las biomoléculas responsables del color característico de las bayas, proporcionando a las frutas maduras su característica coloración azul, roja y púrpura (X. Li et al., 2021). Además, las antocianinas se han relacionado ampliamente con actividades antioxidantes y su ingesta diaria se asocia con una reducción del riesgo de enfermedades (Cassidy et al., 2013; Jennings et al., 2017). Por lo tanto, el contenido de antocianinas en el arándano es uno de los aspectos más importantes que determinan la calidad nutracéutica y los

beneficios humanos, su análisis es importante para determinar la composición de compuestos bioactivos .

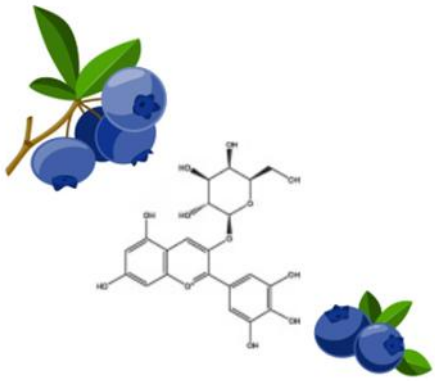


Figura 1.4. *Representación de la estructura de una molécula de antocianina (Delphinidin3-galactoside). Figura modificada de (Yang et al., 2022).*

1.4.1.5 Características del cultivo de arándanos

El cultivo de arándano se desarrolla de manera óptima bajo condiciones de pH bajo (4,5 a 5,5) (Smrke et al., 2021). En comparación con otros cultivos no ericáceos, las plantas de arándano se caracterizan por presentar bajas concentraciones de nutrientes minerales y, por lo tanto, tienden a tener menores requerimientos de nutrientes que otros cultivos frutales (Doyle et al., 2021). Debido a estos requerimientos nutricionales, los productores buscan métodos novedosos para cultivar plantas en regiones con condiciones de suelo subóptimas, siendo una alternativa el cultivo en contenedores con sustrato sin suelo y sistemas de manejo de fertirrigación altamente controlados (Kingston et al., 2017).

En cultivo sin suelo, los arándanos tienen una alta productividad desde el primer año de cultivo, y una de las principales razones para lograr este patrón de crecimiento es que los sustratos sin suelo permiten mejorar el área de raíces controlando el contenido de humedad, limitando el estrés del suelo y las concentraciones de nutrientes (Heller et al., 2022). Así, prácticas hortícolas innovadoras con condiciones ambientales como luz, humedad, temperatura y

concentraciones de CO_2 controladas han permitido cultivos rentables en España, Marruecos, México, Chile, China, Perú y Argentina, donde hace unas décadas no eran habituales los cultivos procedentes de zonas templadas (Bañados, 2009; Fang et al., 2022). Debido a los altos requisitos de las condiciones del suelo para la producción de arándano, en los últimos años, se han realizado estudios en sustratos que, permiten el control preciso de las concentraciones de nutrientes, así como, manejo de riego, entre otros (Fang et al., 2020).

Todas estas investigaciones han desempeñado un papel importante para el manejo y rendimiento del cultivo. Sin embargo, aún falta investigación de los efectos de diferentes composiciones de sustrato sobre la fisiología y la nutrición de arándano variedad Legacy, así como el estudio del efecto que provoca el incremento del CO_2.

1.4.2 Cannabiaceae (Cannabidaceae): Origen y evolución

La familia de cannabiáceas (*Cannabidaceae*) son plantas dicotiledóneas que contiene solo dos géneros Humulus y Cannabis. *Humulus lupulus* (lúpulo) es una hierba trepadora perenne ampliamente cultivada por sus inflorescencias, que se utilizan para dar sabor a la cerveza. *Cannabis sativa* (cáñamo) se cultiva en regiones templadas y tropicales por su fibra y por sus compuestos cannabinoides, entre los cuales los más relevantes son el tetrahidrocannabinol (THC), de efecto psicoactivo, y el cannabidiol (CBD). El cannabis se ha cultivado durante al menos 5000 años, es originario de Asia central y se extiende a todas las áreas templadas y tropicales del mundo. El cannabis ha sido un cultivo de gran importancia por sus fibras duraderas del tronco leñoso se conocen como cáñamo, las cuales han sido utilizadas para producir cuerdas, así como telas finas o ásperas. La planta de Cannabis también es una fuente eficiente de pulpa de papel, ya que produce hasta cinco veces más celulosa por acre por año que los árboles. Las semillas de cannabis son utilizadas como alimento para el hombre, las aves, además de proporcionar aceite de semilla de cáñamo para pintura y jabón (Hodgson, 2012).

1.4.2.1 Cáñamo (Cannabis spp.)

Es una planta anual que pertenece a la familia *Cannabaceae*, fue clasificada botánicamente por primera vez en 1753 por Carl Linnaeus. Posteriormente, en 1785, Jean Baptiste Lamarck descubre otra especie a la cual denomina C. indica. Actualmente, se reconocen trece especies, incluidas C. sativa y C. indica, además de una serie de variedades para las especies C. sativa y C. indica (Ángeles López et al., 2014).

1.4.2.2 Cannabis sativa L.

Cannabis sativa es una planta herbácea de floración anual de hasta 4 m de alto, dioica, de tallo erecto y hojas palmadas estipuladas, las inferiores opuestas y las superiores alternas. Las hojas se encuentran sobre pecíolos de hasta 7 cm de largo. Cada hoja se compone de entre 3 a 9 foliolos angostos, de ápice agudo, con márgenes serrados y tricomas glandulares recostados sobre el haz y el envés de un color más claro. Los tricomas glandulares producen una resina como una forma de proteger a la planta contra las agresiones externas. Tiene inflorescencias en las axilas de las hojas superiores o al terminar las ramas, con brácteas herbáceas y glandulosas. Las inflorescencias masculinas son ramificadas, laxas y con muchas flores; mientras que, las femeninas son densas, pero con pocas flores (de 5 a 8). Las flores masculinas son pediceladas, con perianto de 5 tépalos; y las femeninas son sésiles, con perianto entero, membranáceo y pegado al ovario, persistente en el fruto, ovario con un sólo óvulo y 2 estigmas. El fruto es un aquenio, con una sola semilla, ovoide, algo comprimida, blanco o verdoso teñido de púrpura, encerrado en el perianto. Esta especie puede crecer en la mayoría de los climas, aunque muestra una preferencia por suelos calcáreos, ricos en nitrógeno y con un pH neutro o ligeramente ácido.

Figura 1.5. *Representación típica botánica de cannabis sativa. A. Ilustración botánica de una planta femenina, donde se puede observar flores femeninas con hoja protectora (1), Tricoma glandular (2), Fruto (envuelto en brácteas, expuesto, corte transversal) (3); B. Planta masculina, donde se observa flor masculina (4), grano de polen (5) y principales compuestos cannabinoides (6). Esquema floral basado en* (Pabst et al., 1885)**.**

1.4.2.3 <u>Cannabis sativa L.: Importancia del cultivo.</u>

Originaria de regiones ecuatoriales y subtropicales, principalmente de Asia central, se cree que su cuna se encuentra en dos áreas clave: las estribaciones del Himalaya y las llanuras del Pamir, una alta cordillera situada en el este de Tayikistán, con extensiones hacia Afganistán, la República de China y Kirguistán. A pesar de sus orígenes, el cannabis se ha adaptado ampliamente y tiene una distribución geográfica que abarca Canadá, Estados Unidos, Europa y África.

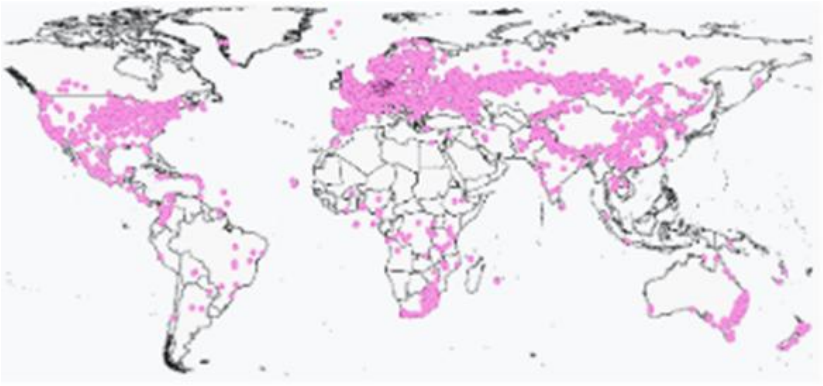


Figura 1.6. *Distribución geográfica de Cannabis sativa L. Adaptado de (Hourfane et al., 2023).*

El cultivo medicinal de cannabis en España fue una práctica común a lo largo de su historia hasta que, en el siglo XX, se prohibió y estigmatizó. En la actualidad, ha resurgido con fuerza debido al impacto generado por la legalización del cannabis medicinal en países como Uruguay, Canadá, Estados Unidos, entre otros. Actualmente, España se encuentra entre los siete países del mundo que producen más marihuana de forma lícita con fines exclusivamente terapéuticos para tratar dolencias y enfermedades.

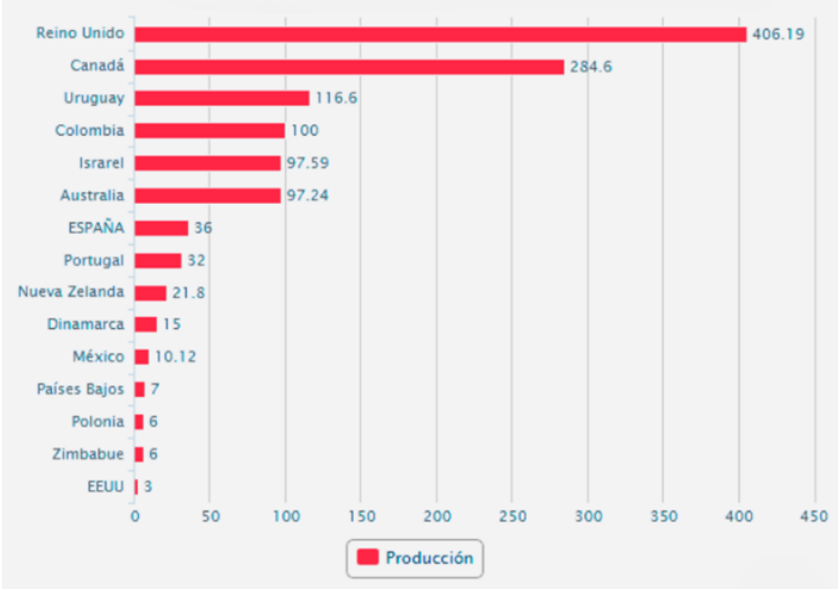


Figura 1.7. *Producción en Toneladas de Cannabis sativa L. datos tomados de Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes, (2023).*

Según la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), la Región de Murcia cuenta con 1,72 hectáreas destinadas al cultivo de cannabis medicinal para su exportación. Además, en Andalucía, Cataluña y Valencia se han habilitado 2,31 hectáreas más para el mismo propósito.

Desde el punto de vista económico, cannabis posee una importancia significativa debido a sus fibras para uso textil o papel, para la obtención de productos para la alimentación, con fines medicinales o para usos cosméticos (Rizzo et al., 2023). En particular, el cannabis ha ganado relevancia en los últimos en diversos campos de investigación, como la microbiología y la oncología (Hong et al., 2022; Taha et al., 2019). Su rica diversidad química ha demostrado ser efectiva contra microorganismos como bacterias, hongos y virus, además de interactuar con componentes celulares como proteínas y genes. Su origen natural lo posicionan como un candidato ideal para abordar enfermedades de difícil tratamiento. Esto incluye problemas terapéuticos como la resistencia a los antibióticos y, en el caso del cáncer, la toxicidad asociada a la ingestión y metabolización de tratamientos convencionales (Gabarin et al., 2023).

Los cannabinoides, flavonoides, estilbenoides, terpenoides, alcaloides y lignanos son algunos de los metabolitos secundarios presentes en C. sativa. Los cannabinoides se producen y se acumulan en los tricomas glandulares que recubren toda la planta, con especial concentración en las inflorescencias femeninas. Estas inflorescencias son la parte más valiosa de la planta para la industria farmacéutica. De los 113 cannabinoides identificados, los más estudiados son el Δ^9-tetrahidrocannabinol (THC), el cannabidiol (CBD) y el cannabigerol (CBG), debido a su notable actividad biológica (Kotiranta et al., 2024).

En la planta, los cannabinoides se encuentran principalmente en forma de ácidos carboxílicos: Δ⁹-ácido tetrahidrocannabinólico (THCA), ácido cannabidiólico (CBDA) y ácido cannabigerólico (CBGA). Estas formas son térmicamente inestables y se descarboxilan al exponerse al calor o la luz (Wang et al., 2016). Estas formas descarboxiladas, THC y CBD, son los compuestos principales utilizados por la industria farmacéutica para aplicaciones medicinales (Boyaji et al., 2020). sin embargo, las concentraciones de estos compuestos dependen del tipo de tejido, edad, variedad, condiciones de crecimiento (nutrición, humedad y niveles de luz), el tipo de sustrato, tiempo de cosecha y condiciones de almacenamiento (Pérez-Bermúdez et al., 2022).

Figura 1.8. *Representación de la estructura de dos cannabinoides descarboxilados de cannabis sativa. A. estructura química del Cannabidiol. B. Estructura química de Tetrahidrocannabinol. Adaptado de (Gabarin et al., 2023).*

1.4.2.4 Características del cultivo de Cannabis.

Actualmente, para la producción de cannabis, se utilizan sistemas de producción sin suelo que emplean medios de cultivo porosos con materiales de origen orgánico e inorgánico. Entre ellos, destacan las mezclas de sustrato compuestas por lana de roca, fibra de coco y turba (Caplan et al., 2017; Chandra et al., 2008; Nemati et al., 2021). Sin embargo, aún no se ha establecido un consenso sobre cuál es la composición ideal de estos medios para optimizar la producción de cannabis (Nemati et al., 2021). Hasta la fecha, diversos estudios

han examinado los factores que contribuyen en el rendimiento del cannabis. durante estas investigaciones se han comparado dos genotipos ricos en Cannabidiol, cultivados en fibra de coco y turba. Este estudio revelo que, la fibra de coco redujo significativamente la producción de biomasa y la absorción de nitrógeno, sin afectar el rendimiento de CBD (Burgel et al., 2020). En contraste, los parámetros de crecimiento de las plantas no difirieron entre la plantas cultivadas en fibra de coco y las cultivadas en mezclas de sustratos a base de turba bajo fertiirrigación, en experimentos con cáñamo industrial (Smith et al., 2021). También se han realizado estudios sobre la dinámica de crecimiento, la formación de rendimiento, la absorción de nitrógeno y los parámetros fisiológicos del cannabis cultivado en lana de roca, fibra de coco y una mezcla de turba y perlita, donde han revelado que la acumulación de biomasa de hojas y tallos se incrementaron con la mezcla de turba y perlita en comparación con la lana de roca y la fibra de coco (Schober et al., 2023). También, se han realizado investigaciones, sobre el efecto de la intensidad de la luz y el fotoperiodo (Magagnini et al., 2018; Moher et al., 2022), la respuesta de la temperatura (Chandra et al., 2008), dosis de fertilización con diferentes composiciones de sustrato (Caplan et al., 2019; Deng et al., 2019), el estrés fisiológico (Park et al., 2022), además del impacto de los métodos de producción en el rendimiento de metabolitos secundarios (Addo et al., 2021). Todas estas investigaciones han desempeñado un papel importante para el manejo y rendimiento del cultivo. Sin embargo, aún falta conocimiento sobre los efectos de los componentes de sustrato en la nutrición de la planta, así como, determinar el papel de las acuaporinas en el crecimiento del cannabis, la optimización de los métodos de cultivo y el rendimiento de los cultivos, así como, el efecto que tiene sobre los metabolitos secundarios.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Justificación

La evolución de la agricultura intensiva ha fomentado la introducción de los sustratos de cultivo. Estos medios de producción son cada vez más indispensables para el progreso de múltiples tareas, como semilleros, viveros y la horticultura intensiva protegida. Los sustratos de cultivo, cada vez más utilizados como sustitutivos del suelo tradicional, proporcionan el anclaje, así como un adecuado crecimiento del sistema radicular de la planta. Además, dependiendo del tipo de sustrato, puede también intervenir en la nutrición y desarrollo del cultivo. por este motivo, se hace imprescindible definir las características físicas y químicas de los sustratos de cultivo optimizadas para cada tipo y variedad de cultivo.

Actualmente el cultivo de arándano y el cultivo de cannabis, presentan una creciente demanda a nivel mundial debido a su alto valor y sus beneficios tanto nutricionales como para la salud. La optimización de estos cultivos en condiciones ambientales controladas, como el uso de sustratos óptimos y el uso de dióxido de carbono suplementario, ofrecen una vía prometedora para mejorar el crecimiento, el rendimiento y la eficiencia en el uso de los recursos. Pese a esto, la interacción entre la composición del sustrato y las necesidades hídricas y nutricionales es de gran importancia. Además, teniendo en cuenta la relación de los sustratos con la absorción y transporte de agua y nutrientes a través de la planta, el ambiente y los parámetros fisiológicos en plantas como arándano y cannabis sigue siendo poco explorada, hemos planteado los experimentos de esta Tesis Doctoral.

La realización de esta investigación está justificada por los siguientes aspectos:

1. Debido a la escasa información sobre el cultivo de cannabis y arándano en sustrato, surgió la necesidad de identificar y caracterizar el sustrato comercial más adecuado para el desarrollo y crecimiento de estas

plantas. Planteamos experimentos basados en las características físicas y químicas del sustrato para estudia en profundidad la respuesta fisiológica de estas plantas.

2. Ante la necesidad de la mejora en la producción, es necesario evaluar los cambios que provocan diferentes componentes de sustratos sobre la fisiología, el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios de plantas de interés agrícola y farmacéutico como son el arándano y cannabis.

3. Comprender los mecanismos de regulación interna del transporte de agua y la influencia de las acuaporinas en la fisiología del cannabis bajo diferentes componentes de sustrato permitirá relacionar la absorción y transporte de agua, el crecimiento y el metabolismo secundario.

4. El impacto del incremento de los niveles de CO_2 en la calidad nutricional de los cultivos, justifican la necesidad de estudiar sus efectos sobre el desarrollo, la nutrición y la producción del cultivo de arándano en diferentes sustratos.

Objetivos

Objetivo General

El objetivo principal de esta tesis doctoral es determinar el efecto de la composición de sustratos en el desarrollo y la fisiología del cultivo de arándano y de cannabis, evaluando su influencia en la disponibilidad de nutrientes y las relaciones hídricas, con el fin de optimizar la productividad y la calidad de estos cultivos, contribuyendo al desarrollo de estrategias agrícolas sostenibles.

Objetivos Específicos

1. Determinar los cambios que provocan los diferentes componentes de sustratos sobre la fisiología, el crecimiento y la producción de Cannabidiol (CBD) del cannabis, identificando el sustrato más adecuado para el cultivo en función de sus efectos sobre las relaciones hídricas y la producción de CBD. ***(Capítulo I).***

2. Evaluar el desarrollo y la respuesta fisiológica, así como, la calidad del fruto de la planta de arándano y de la planta cannabis en condiciones de invernadero, cultivada en diferentes tipos de sustrato con diferentes composiciones, relacionando las características químicas y físicas de los sustratos con el crecimiento, el intercambio hídrico de las hojas y la nutrición mineral de las plantas. ***(Capítulo II).***

3. Evaluar la respuesta en el crecimiento y la producción del cultivo de arándanos ante la suplementación con CO_2 en condiciones controladas de invernadero con diferentes composiciones de sustratos. (**Capítulo III**).

CAPÍTULO I

Aquaporins-mediated water availability in substrates for cannabis cultivation in relation to CBD yield

Capítulo I: ***Aquaporins-mediated water availability in substrates for cannabis cultivation in relation to CBD yield.***

Nidia Ortiz-Delvasto*, Pablo Garcia-Gomez*, Micaela Carvajal & Gloria Bárzana.

*Equal autor contribution

Plant and Soil, 31 October 2023, DOI: 10.1007/s11104-023-06341-8.

Aims

The objective of this study was to identify the most suitable substrate for Cannabis sativa L. cultivation based on its effects on water relations and Cannabidiol (CBD) production.

Methods

Biomass, physiological parameters, minerals, changes in the expression levels of plasma membrane intrinsic Proteins (PIP) and CBD concentration was measured in C. sativa (var. Tiborszallasi) plants cultivated on 5 substrates with different physical–chemical characteristics.

Results

The substrates available water (AW) was the main factor affecting growth and production. The efficiency of the water use was governed fundamentally by transpiration. Experimental substrates(S) 1 and 3 (S1 and S3) were those in which the plants grew optimally and allows plants to invest energy in secondary metabolites production acquiring high levels of CBD. The plants grown in S2 and S5, composed by coconut fiber and perlite, showed the lowest growth in agreement with low transpiration rates which reduce the water uptake. S5 substrate, with some available water (AW) still present, is forcing plants to invest energy in improving water and nutrient transport, as observed by the high levels of nutrients in planta and PIPs expression levels. S4 plants presented the highest inflorescence production and CBD content, which can be attributed to plant stress due to the low levels of AW and high pH and electrical conductivity (EC).

Conclusion

The absorption of water and minerals by plants has been affected by PIP-mediated water transport, playing key roles for the optimal utilization of the water present in the substrates, with specific isoforms involved in these responses.

Plant Soil (2024) 495:469–485
https://doi.org/10.1007/s11104-023-06341-8

RESEARCH ARTICLE

Aquaporins-mediated water availability in substrates for cannabis cultivation in relation to CBD yield

Nidia Ortiz-Delvasto · Pablo Garcia-Gomez · Micaela Carvajal · Gloria Bárzana

Received: 28 June 2023 / Accepted: 9 October 2023 / Published online: 31 October 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Aims The objective of this study was to identify the most suitable substrate for *Cannabis sativa L.* cultivation based on its effects on water relations and Cannabidiol (CBD) production.

Methods Biomass, physiological parameters, minerals, changes in the expression levels of plasma membrane intrinsic Proteins (PIP) and CBD concentration was measured in *C. sativa (var. Tiborszallasi)* plants cultivated on 5 substrates with different physical–chemical characteristics.

Results The substrates available water (AW) was the main factor affecting growth and production. The efficiency of the water use was governed fundamentally by transpiration. Experimental substrates(S) 1 and 3 (S1 and S3) were those in which the plants grew optimally and allows plants to invest energy in secondary metabolites production acquiring high levels of CBD. The plants grown in S2 and S5, composed by coconut fiber and perlite, showed the lowest growth in agreement with low transpiration rates which reduce the water uptake. S5 substrate, with some available water (AW) still present, is forcing plants to invest energy in improving water and nutrient transport, as observed by the high levels of nutrients in planta and PIPs expression levels. S4 plants presented the highest inflorescence production and CBD content, which can be attributed to plant stress due to the low levels of AW and high pH and electrical conductivity (EC).

Conclusion The absorption of water and minerals by plants has been affected by PIP-mediated water transport, playing key roles for the optimal utilization of the water present in the substrates, with specific isoforms involved in these responses.

Keywords Water uptake · Mineral nutrition · PIPs · Substrate physical properties · Inflorescence production

Responsible Editor: Ricardo Aroca.

Nidia Ortiz-Delvasto and Pablo Garcia-Gomez are contributed equally to this work.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1007/s11104-023-06341-8.

N. Ortiz-Delvasto · P. Garcia-Gomez · M. Carvajal · G. Bárzana (✉)
Plant Nutrition Department, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS, CSIC), Campus Universitario de Espinardo, Edificio 25, 30100 Murcia, Spain
e-mail: gbarzana@cebas.csic.es

Introduction

Cannabis sativa L., is a plant with great interest in several industries as pharmaceutical, animal products, cosmetics and food (Burgel et al. 2020). Belonging to the Cannabaceae family, with annual

flowering, it has been cultivated and used for thousands of years for its fiber and psychotropic and medicinal properties (Holmes et al. 2021). Moreover, the role of hemp in soil phytoremediation has been studied (Zerihun et al. 2015; Golia et al. 2021), and some mechanisms employed by hemp in soil phytoremediation have been elucidated (Ahmad et al. 2016). During the last decade, cannabis research related to the genetic and photochemical characteristics of the different varieties has increased (Rull 2022). More than 100 unique cannabinoids have been identified (Ahmed et al. 2015; Caplan et al. 2017), predominantly Δ 9-tetrahydrocanbinolic acid (THCA) and cannabidiolic acid (CBDA). These acids undergo a decarboxylation process during storage and when heated to become neutral cannabinoids such as tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) (Strzelczyk et al. 2021). Years ago, CBD received less attention as a potential drug candidate than tetrahydrocannabinol Delta-9 (Δ9 THC), which is the main psychoactive component of the Cannabis sativa L. plant (Johnson et al. 2023). However, nowadays, due to several medicinal beneficial properties, the interest around the use of CBD in different products is increasing and therefore crops requires much more investigation (Navarrete et al. 2021).

Cannabis presents a life cycle that is divided into two growth stages, a vegetative stage and a flowering stage. The vegetative development stage of plants is characterized by accelerated growth, increasing biomass and, frequently, a higher nutrient requirement (Raviv and Lieth 2008). During the growth stage, hemp also had high water requirements (Adesina et al. 2020). The accumulation of cannabinoids occurs mainly in the flowering stage, but, as secondary metabolites, their concentration may vary depending on the physiological conditions of the plant. Moreover, cannabis mineral nutrition can influence floral dry weight and secondary metabolites concentrations (Caplan et al. 2019; Nemati et al. 2021). However, the water needs and their relation with water uptake and transport through plant have not been studied.

Soilless greenhouse agriculture focuses on the development of new substrates that are profitable, renewable and sustainable in order to facilitate sustainable agricultural production. Thus, it is necessary to identify organic substrates capable of sustaining efficient crop production (Mejía et al. 2022). An adequate substrate is essential to provide the necessary physical and chemical properties for the specific plant or crop and its optimal growth conditions (Burgel et al. 2020; Ortiz-Delvasto et al. 2023). An appropriate growing medium should have good drainage capacity and ample air-filled pore (Zheng et al. 2007), but also it would have good water availability (Nemati et al. 2021).

Apart from water availability in soils, the ability of plants to uptake water needs to be addressed. Therefore, aquaporins (AQPs), which are membrane proteins directly involved in water transport, must be studied. To date, five subfamilies have been identified in plants: intrinsic plasma membrane proteins (PIPs), intrinsic tonoplast proteins (TIPs), intrinsic nodulin26-like proteins (NIPs), small basic intrinsic proteins (SIPs), and intrinsic X proteins (XIPs) (Verdoucq and Maurel 2018). Among the different types of aquaporins, the PIPs1 and PIPs2 clusters play an important role in maintaining water transport within cells. Consequently, they are involved in many physiological processes essential for plant survival and plant responses to stress (Yepes-Molina et al. 2020). Generally, overexpression of these PIP1 and PIP2 aquaporins enhances root, stem and leaves growth and development (Chen et al. 2022). Moreover, PIP aquaporins are also involved in reproductive organ development such as flowering, fruit and seed formation (Chen et al. 2022; Yang et al. 2022a, b). Different PIP2 are up-regulated or down-regulated according to fruit initiation or ripening (Zhu and Ming 2019). In this way, the PIP aquaporins of *C. sativa* should play a key role in both, the vegetative growth stage, which requires a large amount of water and nutrients, and the flowering stage. Recently, 30 Cannabis AQPs has been identified (Guerriero et al. 2019). However, the involvement of aquaporins in *C. sativa* physiology has not been analyzed to date.

For all this reasons, the objective of this study was to determine the changes caused by different substrates on cannabis physiology, growth and CBD production. The investigation was done with 5 experimental substrates (S1-S5) showing different physico-chemical characteristics. For this, the analysis of the biomass production,

photosynthesis, transpiration, mineral nutrition and changes at the expression level of PIP aquaporins in the cannabis plant grown on the different substrates were analyzed. Also, the concentration of CBD in the bud of the plant was associated with the composition of the substrates and the physiological response of the plant.

Materials and methods

Plant material and growth conditions

Seeds of cannabis plants (*Cannabis sativa L. var. Tiborszallasi*), provided by Cultivo Manuel y Rafa 3000 S.L, were germinated in vermiculite, in the dark at 28 °C, for 5 d. Subsequently, they were transferred to round pots of 9 cm diameter with 50% vermiculite and 50% perlite, one plant per pot. Plants were placed in a controlled environment growth chamber with 70–85% relative humidity (RH), 25–30 °C, 485 ppm CO_2 and a photosynthetically active radiation (PAR) of 400 ± 50 µmol m^{-2} s^{-1} with a photoperiod of 18 h/6 h (day/night). The plants were irrigated with a modified Hoagland nutrient solution consisting of NO_3^- (15 mM), $H_2PO_4^-$ (1 mM), K^+ (6 mM), Ca^{2+} (5 mM), Mg^{2+} (2 mM), SO_4^{2-} (2 mM), Fe^{2+} (72 µM), Mn^{2+} (18 µM), Cu^{2+} (3 µM), Zn^{2+} (3 µM), BO_3^{3-} (45 µM) y MoO_4^{2-} (0,1 µM) (Cockson et al. 2019). The plants were irrigated twice a week, until saturation. After 30 days, plants were transplanted into 15 cm diameter pots with 5 different experimental substrates (provided by Projar, Valencia, Spain) composed by: (S1) 70% coconut fiber and 30% peat, (S2) 70% coconut fiber and 30% perlite, (S3) 60% coconut fiber, 30% peat and 10% perlite, (S4) 100% coconut fiber (S5) 90% coconut fiber and 10% of perlite. The experimental design was completely randomized with 6 plants for each of the 5 types of substrate. On day 60 of plant development, conditions were changed in order to stimulate the flowering: photoperiod 12/12 h, PAR 400 ± 50 µmol·m^{-2} ·s^{-1}, 60–75% RH and 22–25 °C. Plants were irrigated with same modified Hoagland solution but with NO_3^- reduced to 9 mM. The harvest was carried out when 70% of the pistils had changed their color to a dark amber (100–103 days). The whole experiment was done in three different assays.

Characterization of the substrates

For the physical analysis of the substrates, a volume of 20 L of each substrate was used. The granulometry was carried out on a dried sample at 40 °C. Total porosity, air space, bulk density, available water (AW), reserve water (RW) and unavailable water (UAW) were determined according to De Boodt et al. (1974). For mineral content analysis, previously lyophilized and finely ground substrate from 5 samples were digested with HNO_3:$HClO_4$ (2:1). Elements were detected by inductively coupled plasma (ICP) assay (Optima 3000, PerkinElmer). pH and electrical conductivity (EC) in the drained solution was measured 4 times throughout the experiment. They were measured in the percolate of the discharge solutions by means of a portable pH/EC meter CM 35 (Hach, Düsseldorf, Germany).

Physiological parameters

Plant height of 6 plants grown on each type of substrate were measured once a week during the experiment. This measurement was made with a tape measure from the base of the stem to the apex of the plant. The floral, leaves and total dry weight were measured in 3 plants per substrate. For this, plants were placed in an oven at 22 °C for 12 days.

Chlorophyll content was determined in fully developed leaves, using a SPAD-502Plus chlorophyll meter (Konica Minolta, Langenhagen, Germany). Photosystem II fluorescence was assessed in fully expanded leaves from the middle third of the crown on sunny days. These measurements were made after the leaves had acclimated to darkness for 30 min, employing leaf clips equipped with light-excluding features. Photosystem II fluorescence was determined with a miniaturized pulse-width-modulated photosynthesis performance analyzer (mini-PAM; Walz, GmbH, Germany). Measurements were made on 6 plants of each substrate, using 5 leaves per plant. 12 measurements were made throughout the experiment.

The transpiration rate was calculated using the gravimetric method (Aroca et al. 2007). For this, the surface of the pots was covered with aluminum foil and the pot-plant system was weighed obtaining the initial weight (W_0). After 24 h, all the pots were weighed again, obtaining the final weight (W_f). The leaf transpiration rate (T) was calculated as:

$$T = (W_0 - W_f)/t * FW$$

where t = time in hours and FW = fresh weight in grams. Measurements were made on 4 plants of each substrate.

Mineral contents have been analysed in leaves and inflorescences. All leaves and inflorescences were collected from the dried plant material. Mineral concentrations were determined by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) using a Thermo ICAP 6500 Duo equipment (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For each sample, 200 mg were added in a microwave furnace equipment to a 25 ml tube with a mixture of 4 ml of HNO_3 (68% purity) and 1 ml H_2O_2 (33% purity) for their subsequent digestion. 300 ml high-purity de-ionized water, 30 ml H_2O_2 (33% purity) and 2 ml H_2SO_4 (98% purity) were also added in the Teflon reactor. The microwave heating digestion program consisted of 3 steps: starting at 20 ºC and 40 bar; increasing 10 bar / minute for 30 min up to 220 ºC; and keeping 220 ºC for 20 min. After cooling, the mineralized sample were transferred to double gauge tubes of 10 mL (micro minerals) and 25 mL (macro minerals) and the volume made up with high-purity de-ionized water. A multimineral standard solution containing 31 minerals supplied by SCP Science (Quebec, Canada) was used to prepare calibration standards in high-purity de-ionized water. For ICP-OES analyses, two control samples containing high-purity de-ionized water and a multimineral standard were used. Each mineral determination was performed at specific wavelengths ranging from 167.1 to 670.8 nm. The concentration of macro and micro minerals were calculated according the formula "mg Kg^{-1} or µg Kg^{-1} (C x D) / W"; where C was mineral concentration, D was the dilution factor and W was sample weight. subsequently these results were calculated to be expressed in mmol or µmol / Kg DW.

Concentration of CBD

For CBD extraction, 100 mg of flowers, previously dried and ground, were mixed with 10 mL of absolute ethanol extraction solvent and stirred in a vortex. Subsequently, the sample was sonicated for 30 min and then stirred at 25ºC for 15 min, according to Berman et al. (2018), then allowed to settle at room temperature and subsequently filtered through a filter 0.22 µm PVDF (Milipore, Beford, MA, USA). CBD was quantified by UPLC-QtoF-MS, using a Waters Acquity I-Class UPLC coupled to a quadrupole flight-type mass spectrometry detector (Bruker maXis impact model) and equipped with an electrospray source type ESI (Bruker Daltonics, Bremen Germany). Quantification by UPLC-MS was performed using the external standard method, measuring the peak areas of the cannabinoids. To do this, the mass of the pure standard (m/z = 313.2162) was measured in negative mode [M-H] and subsequently said ion was identified in the samples of ethanolic extracts of flowers. Cannabidiol Solution – 1.0 mg/mL in methanol, ampule of 1 mL (Sigma, Darmstadt, Germany) was used as a pure standard to perform the quantification.

PIP genes expression

RNA isolation was performed using the NZYtech total RNA extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany), according to the manufacturer's protocol. 3 plants per group were used. The quantity and purity of RNA were analysed with a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). The High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) was used to synthesise cDNA from 2 µg of total RNA, according to the manufacturer's protocol.

For Primers design all the sequences (8) of plasma membrane intrinsic proteins (PIPs) available for *C. sativa* were obtained from NCBI database and the primer sets were specifically designed in the 3′ or 5′ non-coding region of each gene, in order to avoid the non-specific amplification of other aquaporin genes (Online Resource 1). The efficiency of the primer sets was evaluated with the software QuantStudio 5 (QuantStudio Design and Analysis Software version 1.4.0.0), by analysing the threshold cycle (Ct)/fluorescence ratio at six independent points of PCR curves (Ramakers et al. 2003), giving values between 95 and 100% (Online Resource 1). Five housekeeping primers—18S ribosomal RNA (id: XM_030651156.1), Elongation factor 1-gamma (id: XM_030649893.1), Protein phosphatase 2A subunit (id: XM_030625838.1), E3 ubiquitin-protein ligase (id: XM_030633681.1) and tubulin alpha-3 chain (id: XM_030654744.1)— for *C. sativa* were selected according to Deguchi et al. (2021), checked in each cDNA using the quantitative PCR quantification (qPCR) and analysed with Visual basic application for Excel (GeNorm) that automatically calculates the gene stability (Vandesompele et al. 2002). 18S ribosomal RNA (18S) was then selected as the reference gene for the standardisation.

Real-time PCR analysis was performed on 3 independent samples for each treatment (biological replicates) and each sample reaction was carried out in triplicate (technical replicates) in 96-well plates in a QuantStudio 5 Flex, a Real-Time qPCR system (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific), following the manufacturer's instructions. The qPCR program consisted of 10 min initial denaturation at 95 °C, and then amplification in a two-step procedure: 15 s of denaturation at 95 °C and 60 s of annealing and extension at a primer-specific temperature for 40 cycles, followed by a dissociation stage. Data collection was carried out at the end of each round in step 2. These conditions were used for both target and reference genes, and the absence of primer-dimers was checked in controls lacking templates. The transcript levels were calculated using the $2^{-\Delta Ct}$ method (Schmittgen and Livak 2008) and presented as relative units.

Data analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS 25.0.0.1 software package. Data were analyzed by one-way ANOVA and later Duncan's multiple comparison test. Significant differences were determined between the values of each determination at $p \leq 0.05$, according to Duncan's test. Values presented are means ± SE.

Results

Physical and chemical characteristics of the substrates

Physical properties of substrates are shown in Table 1. Substrates S4 and S5 presented higher total porosity, airspace and less bulk density than substrates S1, S2 and S3, presenting S2 the lowest airspace and maximum bulk density. In case of water parameters, S3 showed the most quantity of available water (AW), followed by S1 and S5, whereas S4 accumulated the less values of water availability. Reserve water (RW) was highest in S2 followed by S3, been S4 the substrate with less RW. The analysis of unavailable water (UAW) showed that S3 had the highest value of UAW. On the opposite, S1 and S2, in that order, were the substrates which had less UAW.

The content of minerals (Table 2), macronutrients and sodium (Na) (Table 2a) and micronutrients (Table 2b), was determined in substrate samples. Na showed differences among substrates being higher in S4 and S5, followed by S1 and S3, while S2 had the lowest concentration. Ca and Fe were higher in S4 and S5 substrates and minimum in S3. By contrary, Mg and Zn were highest in S3 and lowest in S4 and S5. S2 showed the second higher concentration of Mg and Zn (followed by S1), and the higher P, B, Cu and Mn values, which were minimum in S4 and S5. Also S2 showed the highest concentration of K, followed by S5 whereas, while S4 had the lowest K content.

The pH and the EC of the percolated watering solution (Fig. 1) were analyzed. Both, pH and EC, decreased over time in all substrates. In both measurements substrate S4 presented the highest average pH and EC values followed by S5. Both presented significant higher values than S1, S2 and S3, which not present significant differences among them at the end of the experiments.

Physiological measurements

Plant height (Fig. 2a) grown on the different substrates was measured over time. Plants grown on the S3 substrate were significantly taller compared to all other plants. The plants cultivated in S1 and S4 were

Table 1 Physical properties of substrates: Total porosity, air space, bulk density, available water (AW), reserve water (RW), unavailable water (UAW). Values are the mean of 3 samples ± SE. Means followed by different letters were significantly different according to Duncan's test ($p \leq 0.05$)

Substrate	Total porosity (%)	Air Space (%)	Bulk density (g cm-3)	AW (%)	RW (%)	UAW (%)
S1	91 ± 0.15b	23 ± 1.43b	0.131 ± 0.003b	29.8 ± 3.42b	4.6 ± 0.05d	25.5 ± 0.97d
S2	91.6 ± 1.16b	16 ± 1.72c	0.155 ± 0.007a	19.7 ± 1.58c	11.5 ± 0.01a	29.3 ± 0.88c
S3	90.8 ± 0.65b	17 ± 0.84c	0.119 ± 0.004c	38.9 ± 1.92a	8.2 ± 0.03b	34.3 ± 0.76a
S4	96.6 ± 2.97a	35 ± 0.62a	0.089 ± 0.009d	7 ± 0.53d	3.9 ± 0.02e	32.5 ± 0.83b
S5	94.4 ± 1.38a	36 ± 0.83a	0.09 ± 0.003d	25.6 ± 1.64b	6.1 ± 0.08c	32.4 ± 0.84b

Table 2 Analysis of mineral content in substrates: Macronutrients and sodium (a) and micronutrients (b) of each substrate. Values are the mean of 3 samples ± SE. Means followed by different letters were significantly different according to Duncan's test ($p \leq 0.05$)

a. Macronutrients and sodium (mmol/Kg DW)

Substrate	Ca	K	Mg	P	Na
S1	40,968 ± 0,083c	530,719 ± 0,623c	53,396 ± 0.004b	130,579 ± 0.004b	5.224 ± 0.008c
S2	41,051 ± 0,002c	614,218 ± 0,004a	54,777 ± 0,004b	143,955 ± 0,003a	3.795 ± 0.005d
S3	38,476 ± 0,517d	534,752 ± 4,266c	73,581 ± 2,966a	112,468 ± 2,090c	4.959 ± 0.144c
S4	169,957 ± 0,201a	521,393 ± 2,971d	43,442 ± 0,063c	16,615 ± 1,208d	49.228 ± 0.176a
S5	153,324 ± 0,682b	570,852 ± 1,540b	42,208 ± 0,063c	10,615 ± 0,151e	46.435 ± 0.144b

b. Micronutrients (mmol/Kg DW)

Substrate	B	Cu	Fe	Mn	Zn
S1	2.164 ± 0.002b	0.067 ± 0.003b	0.712 ± 0.004d	0.765 ± 0.006c	0.348 ± 0.005c
S2	2.390 ± 0.004a	0.077 ± 0.001a	0.821 ± 0.003c	0.961 ± 0.002a	0.394 ± 0.002b
S3	2.057 ± 0.387c	0.075 ± 0.001a	0.581 ± 0.005e	0.907 ± 0.001b	0.406 ± 0.002a
S4	1.195 ± 0.009d	0.048 ± 0.003c	5.800 ± 0.006a	0.679 ± 0.002d	0.109 ± 0.004d
S5	1.005 ± 0.003e	0.032 ± 0.003d	4.010 ± 0.006b	0.461 ± 0.019e	0.090 ± 0.009e

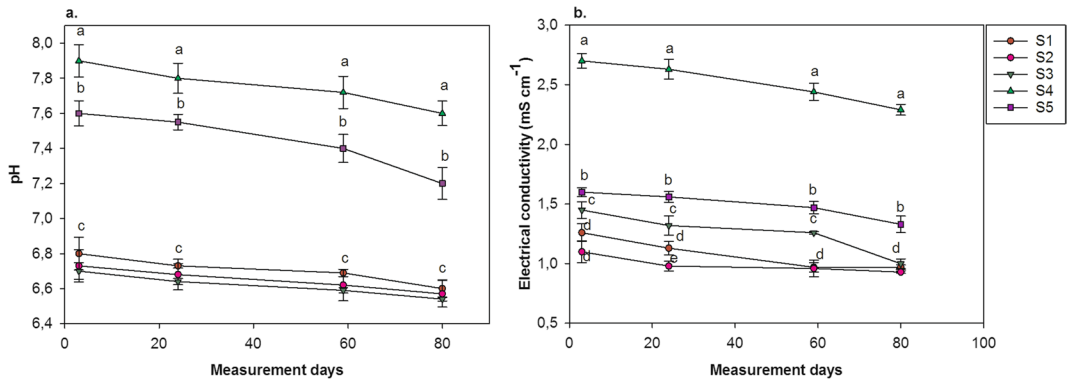


Fig. 1 pH (**a**) and electrical conductivity (**b**) of the substrates measured during the development of the experiment. Each substrate is represented with a different color: S1 brown, S2 pink, S3 grey, S4 green and S5 purple. The points show the mean of 6 plants ± SE. Means of each day followed by different letters were significantly different according to Duncan's test ($p \leq 0.05$). The graph was made with SigmaPlot 14.5

the seconds in plant height and did not present significant differences between them. Plants grown in S5 substrate had the lowest height. The dry weight of leaves and inflorescences were measured at the end of the experiments (Fig. 2b). Plants grown on S1 and S3 reached a significantly higher leaf dry biomass compared to S2, S4 and S5. The plants cultivated in the substrates S3 and S4 presented the highest yield in the dry weight of the inflorescence, followed by plants cultivated in S1 without significant differences. The S5 substrate presented the lowest quantity of dry leaf and inflorescences biomass.

SPAD values (Fig. 3) measured weekly in fully developed young leaves, indicate the concentration of chlorophyll both in the vegetative stage and in the reproductive stage. The results showed a lot of variations during the experiment with significant differences among treatments. Plants grown on substrates S1, S2, S3 and S5 presented strong variations during time course of the vegetative stage. S3 generally presented significantly the highest

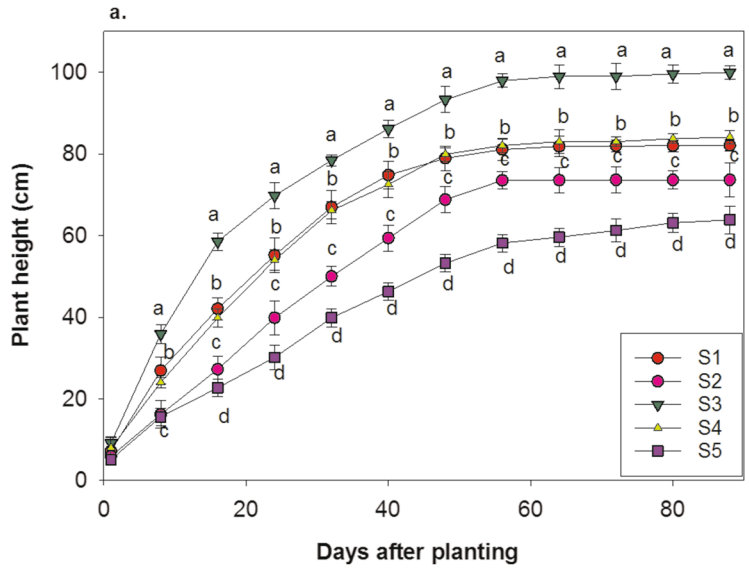


Fig. 2 Average height and Average dry weight of the leaves and the inflorescence of plants grown in different substrates. (**a**) Average height of plants grown in different substrates measured during the development of the experiment Each substrate is represented with a different color: S1 brown, S2 pink, S3 grey, S4 green and S5 purple. The points show the mean of 6 plants ± SE. (**b**) Average dry weight of the leaves and the inflorescence of plants grown in the different substrates. Values are the mean of 3 samples ± SE. Means of each day followed by different letters were significantly different according to Duncan's test ($p \leq 0.05$). The graph was made with SigmaPlot 14.5

b.

Substrate	Leaves DW (g Plant^{-1})	Inflorescence DW (g Plant^{-1})
S1	14.18 ± 1.22a	12.22 ± 0.90a
S2	9.53 ± 1.18b	11.48 ± 0.84a
S3	15.69 ± 1.77a	13.16 ± 1.51a
S4	9.49 ± 1.28b	13.38 ± 1.37a
S5	8.78 ± 1.82b	8.83 ± 0.95b

values in reproductive stage, followed by S1 and S2. Plants grown on the S4 substrate presented the lowest values with significant differences during all the experiment compared with the rest of the plants.

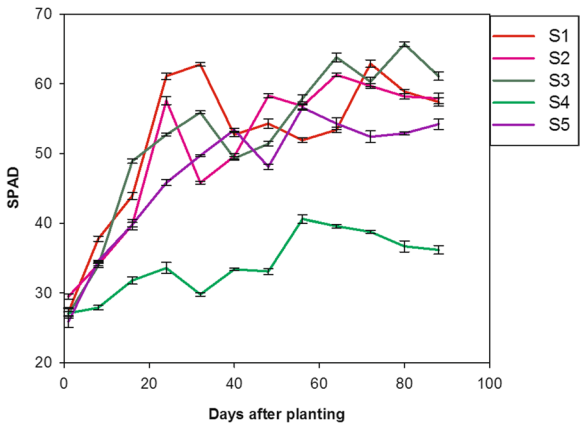


Fig. 3 SPAD values of plants grown in the different substrates measured during the development of the experiment. Each substrate is represented with a different color: S1 brown, S2 pink, S3 grey, S4 green and S5 purple. The points show the mean of 6 plants ± SE. The graph was made with SigmaPlot 14.5

The efficiency of photosystem II (Fig. 4) showed that plants grown on the substrate S1 and S3 presented the highest efficiency and non-significant differences between them, followed by plants grown on S2 and S5, also without significant differences. The plants cultivated on S4 substrate presented the lowest efficiency.

Figure 5 shows the transpiration rate of plants grown on different substrates at the end of the experiment. The plants cultivated on substrate S1, followed by plants grown on S3, presented the highest transpiration rate. Plants cultivated on S4 and S5 showed low levels of transpiration with no significant differences between them. Plants cultivated on S2 showed the lowest transpiration rate.

Nutrients content

Table 3 shows the concentration of macronutrients (Table 3a) and micronutrients (Table 3b) of leaves of plants grown on different substrates. Plants grown

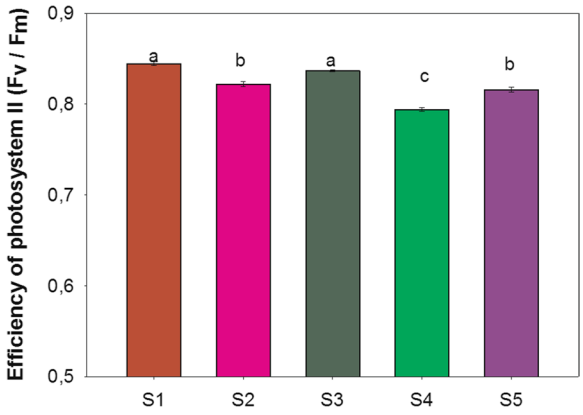


Fig. 4 Efficiency of photosystem II of plants grown in the different substrates. Each substrate is represented with a different color: S1 brown, S2 pink, S3 grey, S4 green and S5 purple. Values are the mean of 6 samples ± SE. Means followed by different letters were significantly different according to Duncan's test ($p \leq 0.05$). The graph was made with SigmaPlot 14.5

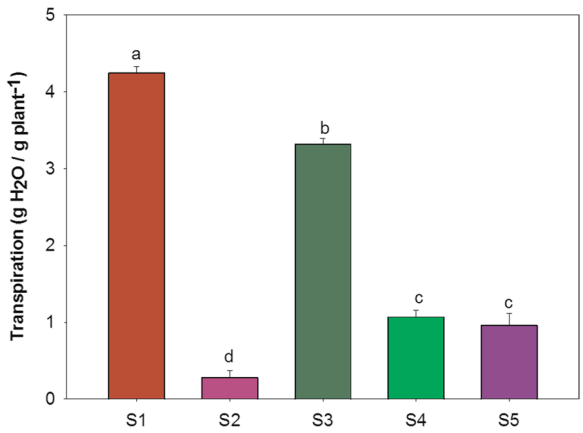


Fig. 5 Transpiration of the cannabis plants grown in the different substrates. Each substrate is represented with a different color: S1 brown, S2 pink, S3 grey, S4 green and S5 purple. Values are the mean of 6 samples ± SE. Means followed by different letters were significantly different according to Duncan's test ($p \leq 0.05$). The graph was made with SigmaPlot 14.5

in S3 presented the highest content of N followed by S4 and S5 plants. Ca content did not present changes in the leaves of the plants of any of the substrates. K was higher in the leaves of plants grown in S4 and S5, while these plants presented the lowest Fe and Mn contents. By his side, plants grown in S1 presented the highest contents of P, Cu, Fe and Mn in leaves, followed by S3 plants, which presented high values in all nutrients measured with K exception. In general, S2 plants presented the lowest content in almost all the nutrient in leaves (N, Ca, Mg, S, B and Cu), being significant in case of B and Cu respect to all other substrates. B presented its highest values in S5 plants followed by S3 and Zn was similar in all leaves.

The concentration of all mineral nutrients was determined in samples of dry inflorescences (Table 4), divided in macronutrients (Table 4a) and micronutrients (Table 4b). In general, plants grown on S1 and S3 showed the highest nutrients accumulation in the inflorescences, with the highest values in almost all nutrients (Mg, P, Cu, Fe, Mn and Zn). By contrary, Plants cultivated in S2 showed the lowest content in all nutrients, with significant lower values in Ca, Mg and Cu contents. The N, K and B content in the inflorescence of the plants grown on the different substrates did not show significant differences.

Concentration of CBD

The content of cannabidiol (CBD) in the inflorescences of plants grown in the different substrates showed significant differences (Fig. 6). The inflorescences of the plants grown on S4 substrate, presented the highest CBD content followed by plants from S3 substrate, then S1 plants and finally S2 and S5 plants, being the flowers of plants grown in S5 substrate the ones that presented the lowest content of CBD.

Expression of the aquaporins

The analysis of the expression of the PIP aquaporins in leaves (Fig. 7) revealed that the plants cultivated on S5 showed the highest expression of the analyzed PIPs1 aquaporins (Fig. 7a, 7b, 7c and 7d), and these plants had significant differences compared with the plants grown on the other substrates. Plants grown on the rest of substrates showed no differences in their *PIP1.1*, *PIP1.2* and *PIP1.3* expressions, while *PIP1.4* of plants grown on S4 had the second highest expression of this aquaporin, followed with no significant differences by plants grown on S2. Plants cultivated on S1 showed the lowest *PIP1.4* expression. In relation to the expression of PIPs2 (Fig. 7e, 7f, 7g and 7h), significant differences were also observed between the plants grown in the different substrates. *PIP2.1* showed a significant higher expression in plants

Table 3 Analysis of mineral content in cannabis leaves: Foliar macronutrients (a) and Foliar micronutrients (b) content. Values are the mean of 3 samples ± SE. Means followed by different letters were significantly different according to Duncan's test ($p \leq 0.05$)

a. Foliar macronutrients (mmol/Kg DW)

Substrate	Ca	K	Mg	P	S	N
S1	277.54 ± 33.58a	1082.24 ± 29.75c	94.50 ± 4.06b	207.29 ± 5.03a	101.21 ± 0.06b	2867.26 ± 42.26b
S2	230.61 ± 33.53a	1236.99 ± 57.43bc	90.14 ± 7.13b	171.67 ± 2.93b	98.73 ± 5.52b	3080.64 ± 40.39ab
S3	327.91 ± 46.73a	1243.31 ± 40.24bc	121.05 ± 11.57a	172.79 ± 7.51b	127.84 ± 5.70a	3282.73 ± 117.92a
S4	300.64 ± 13.95a	1498.51 ± 67.90a	120.64 ± 2.27a	148.20 ± 16.27b	106.40 ± 3.96ab	3187.28 ± 75.61a
S5	351.85 ± 45.07a	1375.74 ± 94.28ab	137.51 ± 8.87a	147.58 ± 2.89b	121.65 ± 13.98ab	3181.16 ± 89.02a

b. Foliar micronutrients (mmol/Kg DW)

Substrate	B	Cu	Fe	Mn	Zn
S1	4.097 ± 0.379abc	0.123 ± 0.009a	1.524 ± 0.101a	1.002 ± 0.094a	0.599 ± 0.028a
S2	2.925 ± 0.227c	0.065 ± 0.003b	1.166 ± 0.015b	0.927 ± 0.037ab	0.534 ± 0.035a
S3	4.512 ± 0.257ab	0.118 ± 0.013a	1.519 ± 0.101a	0.875 ± 0.108ab	0.589 ± 0.061a
S4	3.314 ± 0.185bc	0.097 ± 0.010a	0.816 ± 0.115c	0.719 ± 0.048b	0.491 ± 0.031a
S5	5.245 ± 0.865a	0.104 ± 0.008a	1.157 ± 0.060b	0.866 ± 0.083ab	0.584 ± 0.093a

Table 4 Analysis of mineral nutrients in cannabis inflorescences: Inflorescences macronutrients (a) and inflorescences micronutrients (b). Values are the mean of 3 samples ± SE. Means followed by different letters were significantly different according to Duncan's test ($p \leq 0.05$)

a. Inflorescences macronutrients (mmol/Kg DW)

Substrate	Ca	K	Mg	P	S	N
S1	155.76 ± 14.76a	1054.36 ± 7.61a	115.97 ± 1.89a	327.76 ± 11.05a	104.23 ± 9.34a	3388.30 ± 56.09a
S2	60.98 ± 21.21b	1132.25 ± 34.39a	60.15 ± 8.72c	227.10 ± 16.65b	91.81 ± 10.35a	3335.57 ± 79.51a
S3	147.78 ± 19,29a	977.84 ± 40.95a	122.45 ± 8.21a	239.52 ± 5.78b	105.80 ± 5.41a	3326.97 ± 170.41a
S4	110.44 ± 2.54ab	1060.77 ± 69.35a	89.51 ± 2.71b	231.10 ± 8.35b	105.16 ± 2.81a	3441.40 ± 195.92a
S5	158.21 ± 19.26a	1011.26 ± 62.99a	94.29 ± 3.03b	230.13 ± 11.07b	101.61 ± 0,20a	3632.94 ± 238.22a

b. Inflorescences micronutrients (mmol/Kg DW)

Substrate	B	Cu	Fe	Mn	Zn
S1	2.086 ± 0.105a	0.235 ± 0.023a	1.886 ± 0.009a	1.212 ± 0.098a	1.189 ± 0.030a
S2	1.819 ± 0.104a	0.066 ± 0.007c	0.883 ± 0.098b	0.517 ± 0.118b	0.879 ± 0.069b
S3	2.216 ± 0.045a	0.153 ± 0.012b	1.403 ± 0.095ab	1.072 ± 0.114a	0.994 ± 0.004ab
S4	2.018 ± 0.136a	0.123 ± 0.009b	0.854 ± 0.256b	0.655 ± 0.044b	0.953 ± 0.147ab
S5	2.430 ± 0.352a	0.128 ± 0.017b	1.191 ± 0.218b	0.739 ± 0.022b	0.883 ± 0.071b

grown on S4 substrate (Fig. 7e), followed by S2 and S3 plants. *PIP2.2* and *PIP2.7* had a similar expression pattern, S5 showed the highest expression, whereas plants cultivated on the others substrates showed no significant difference among them. In case of *PIP2.3* expression, plants grown on S5 showed the highest expression of this aquaporin followed, without significant differences, by plants grown in S3. Plants cultivated on S1, S2 and S4 did not show any significant differences among them in *PIP2.3* expression.

Discussion

It is known that substrates present physical–chemical characteristics which will influence plants growth and development. Cannabis plants require high amount of water, especially during their vegetative stage (Adesina et al. 2020). In that sense, S3 was the substrate with high AW, UAW and RW, showing a great capacity to support water requirements of cannabis. Additionally, S1, which had high available water (AW), exhibited favorable characteristics for cannabis growth. Both substrates contained peat in

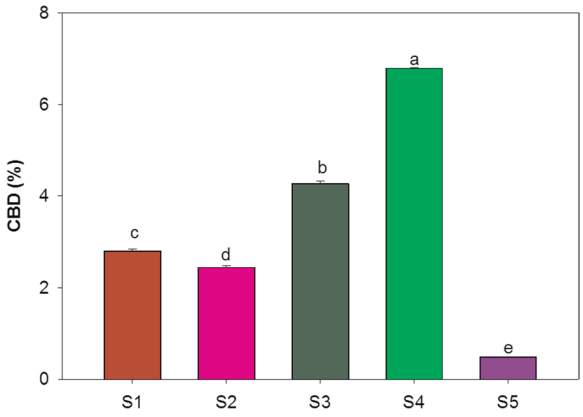


Fig. 6 Cannabidiol (CBD) content present in the inflorescences of cannabis plants grown in the different substrates. Each substrate is represented with a different color: S1 brown, S2 pink, S3 grey, S4 green and S5 purple. Values are the mean of 3 samples ± SE. Means followed by different letters were significantly different according to Duncan's test ($p \leq 0.05$). The graph was made with SigmaPlot 14.5

their composition and shared similar physical properties, such as low porosity, limited air space, and a high amount of AW. On the other hand, S2, composed of 70% coconut fiber but lacking peat, displayed air space and porosity similar to those of S3 and S1. However, its AW was significantly reduced, while residual water (RW) content was the highest. This suggests that the perlite content may be related to this parameter. In other way, coconut fiber substrates, known to have high aeration capacity but low water retention was related to the high total porosity and air space S4 and S5 substrates, but lower bulk density and lower total available water (AW and RW) appeared.

It has been reported that pH influenced greatly the nutrient absorption of plants depending soil composition (Sarkar and Wynjones 1982). During the assays, the pH gradually decreased in all the substrate percolates. These results are consistent with those reported by Caplan et al (2017), who observed a gradual decrease in pH over time. Some authors reported that cannabis plants yield was the highest when soil pH was 6.6–6.8 (Coffman and Gentner 1975) due to nutrient availability. In this sense, S1, S2 and S3 has optimal values, while S4 and S5 showed the highest values of pH in the filtered solution (from 7.9 to 7.7 in S4 and from 7.6 to 7.3 in S5) which is above the optimal pH for cannabis growth. Electric conductivity (EC) of watering solution also exerts an influence in plant growth, and it has been reported a negative correlation between plant growth and EC on hemp (Anderson et al. 2021). In our results, S4 showed the highest EC (2.5 mS cm^{-1}) compared with the others, followed by S5 (1.5 mS cm^{-1}). As the irrigation of all plants was done with the same growth solution, we assume that this difference in EC might be due to the different substrate composition. Both, S4 and S5, were made with > 90% coconut fibre but with different water retention due to the small amount of perlite in S5, and analysing the mineral composition, both had the highest levels of Na, Ca and Fe compared to all the others substrates, being higher in S4 than S5. Thus, we can assume that EC differences in our substrates were mainly due to Na, Ca and Fe contents.

To analyse the effect on plant growth and development induced by the substrates, plant biomass and physiological parameters were measured. Plants grown on S1 and S3 had the highest amount of leaves per plant, high height and inflorescence production, being those parameters greater in S3 plants. In agreement, these S1 and S3 plants showed high amount of chlorophylls and were the ones which showed the highest efficiency in the photosystem II (85%). It has been reported that the increase of AW in soils enhances transpiration, stomatal conductance and maximum net assimilation rate, resulting in higher photosynthetic capacity in species such as *Robinia pseudoacacia* (Liu et al. 2013) or *Jatropha curcas* (Pérez-Vázquez et al. 2013). This has also been reported in wild *Medicago arborea* and *Medicago citrina* (LEFI et al. 2004) and in grass species such as *Agrostis capillarus* (Joseph et al. 2014). Also in that sense, S1 and S3 plants showed the highest levels of transpiration, as a direct consequence of the high amount of AW, pointing to a great importance of apoplastic pathway in cannabis when high level of water was available. Besides, their mineral content is slight different, with S3 having the greatest amounts of Mg, Cu, Mn and Zn, and the highest amount of water in all stages (AW, UAW and RW), so it can be assumed that these characteristics enhanced greatly plant growth in S3. It seems that perlite presence in the composition increase reserve water and nutrients retention in these substrate.

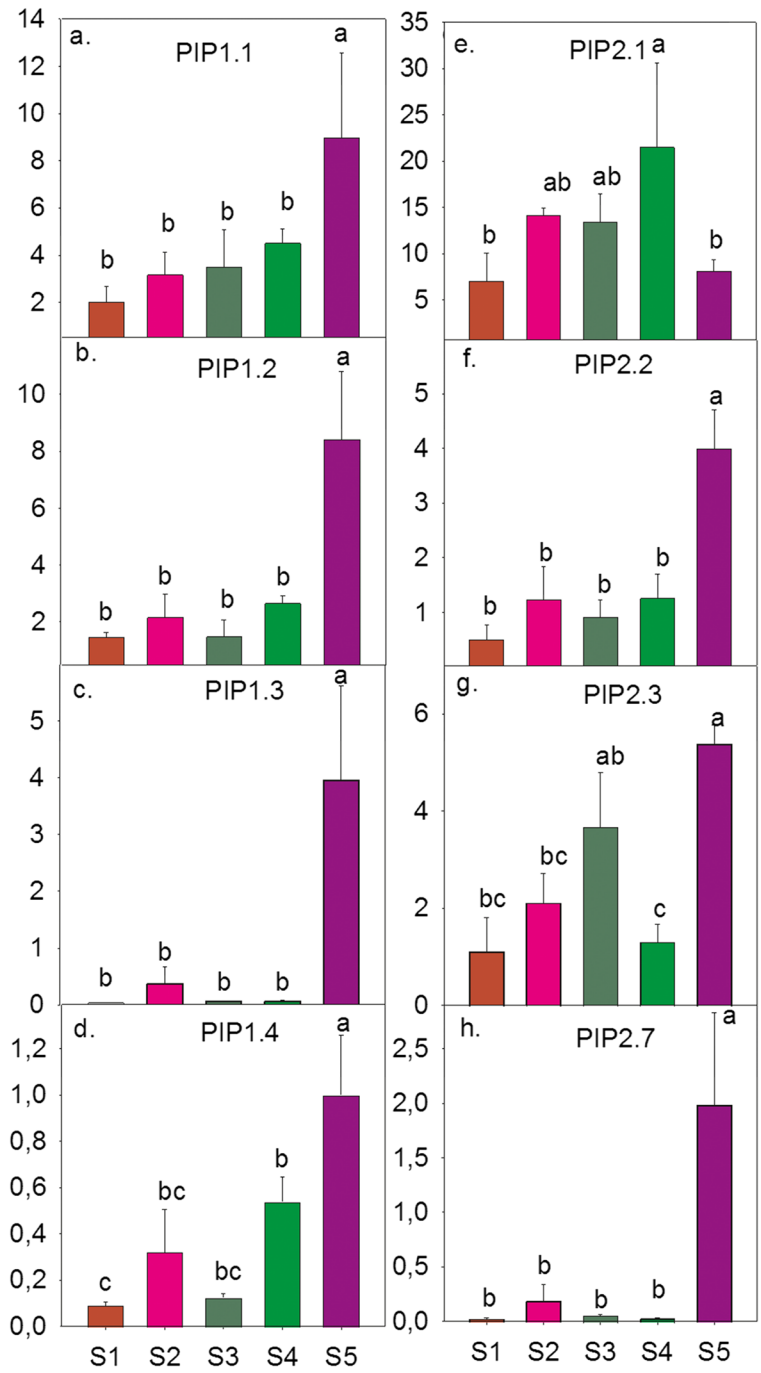


Fig. 7 Relative expression of PIPs genes (**a**) PIP1.1, (**b**) PIP1.2, (**c**) PIP1.3 (**d**) PIP1.4 (**e**) PIP2.1 (**f**) PIP2.2 (**g**) PIP2.3 and (**h**) PIP2.7 in cannabis leaves of plants grown in the different substrates. Each substrate is represented with a different color: S1 brown, S2 pink, S3 grey, S4 green and S5 purple. Each value represents the mean of 3 young leaves mix from 3 different plants with 3 technical replicates of each measurement ± SE. Means followed by different letters were significantly different according to Duncan's test ($p \leq 0.05$). The graph was made with SigmaPlot 14.5

Coconut fiber has been commonly considered as a good substrate for cannabis because it presents high aeration capacity, even when it has little total and easily available water retention (Abad et al. 2005; Vargas-Tapia et al. 2008), but in a study carried out by Burgel et al. (2020), they found that cannabis plants grown in a substrate composed of 100% coconut fiber had lower height in relation to plants grown in peat or peat + green fiber, which is consistent with our results. Indeed, plants grown on S2 and S5 showed less plant height, leaves and inflorescences compared with plants grown on substrates with peat in its

composition. Nevertheless, between them, S2 plants grew better, being higher and showing more number of inflorescences than S5 plants. These differences can be partially explained because substrates were made with coconut fibre, but differed in their quantity (70% in S2 and 90% in S5), which affected directly to porosity, air space and available water. Therefore, this parameter was lower in S2, while bulk density and reserve water were greater in S2 substrate. Again, higher perlite content seems to have an effect in increased RW and nutrients retention. Also, the contain of perlite altered the percolated solution, which has less pH and EC in S2 than S5. So, the higher % of perlite in substrates mixed with coconut fibres favours plant growth and development, probably by reducing drainage and lowering pH and EC of watering solution to more adequate levels for hemp growth.

It should be noted that the lower availability of water in substrates based on coconut fiber (S2, S4 and S5) generated a reduction in the transpiration rates of the plants that grow on them, which could be a symptom of water stress (Aroca et al. 2007) that could be leading to the reduction of vegetative growth and leaf development. In that sense, is interesting that plants cultivated on S4 (100% coconut fibre) were the second tallest (equally with S1) and had similar amount of inflorescences to S3, but they had much less leaf biomass with the lowest levels of chlorophylls (SPAD) and photosynthetic efficiency, as well as low transpiration rate, indicating that a putative stress situation was widely affecting these plants. The variations in SPAD values among the different substrates and growth stages were likely due to a combination of factors, including substrate composition and plant growth stage. As each substrate had distinct characteristics, such as nutrient content, pH levels, and water retention capacity, the differences have significantly impacted photosynthetic efficiency. In this way, the experiment monitored SPAD values in fully developed young leaves during both the vegetative and reproductive stages of plant growth has been reported to vary between these stages due to changing physiological requirements (Zhang et al. 2021) In the vegetative stage, plants focus on leaf development and photosynthesis, while in the reproductive stage, energy may be redirected towards flowering and seed production.

This stress could be attributed to substrate physical properties, as it was the substrate with lowest AW and RW contents and highest pH and EC values, not optimal for cannabis vegetative growth. However, the stress situation leads to greater flowering and, as we will discuss later, greater accumulation of CBD.

The analysis of mineral content of leaves showed that there was a positive correlation between growth and the content of Fe. Fe content in leaves is necessary to photosystems structure and function (Higuchi and Saito 2022) and in our experiments it was directly correlated to this parameter, being efficiency in the photosystem II maximum in S1 and S3 plants and with lowest values in S4 plants. The nutrient uptake by plants and their growth has been reported to be modulated by physical properties of soils (Raviv et al. 2004; Soong et al. 2020). In this sense, we observed that S1 and S3 somehow enhanced mechanisms to boost Ca and Fe uptake when these cations were available. The availability of Fe was strongly dependent on pH (Kim and Guerinot 2007) and the correlation between pH in the substrate percolate and Fe content in leaves was clear in our results. Also, the high transpiration levels, which improve transport of Fe and Ca by apoplastic pathway to the leaves, (Kim and Lou 2007; Pathak et al. 2021) could be the driven way in the nutrients transport in S1 and S3 plants. Interestingly, S2 substrate presented the highest values of K, P, B, Cu and Mn and high amount of RW that could, at a given moment, be available for the plants. However, this water and nutrients could be retained in the substrate by the high perlite content, but not being absorbed by the plants, resulting in lower levels of nutrients in the leaves and inflorescences of those plants compared to all other plants, driving to reduced growth, leaves and inflorescences DW compared to S1 and S3 plants. Again, the low level of transpiration in this case, seemed to be key in the absorption of water and nutrients in cannabis, which pointed to a great importance of the apoplastic pathway in the growth and develop of cannabis plants in relation to water and nutrients transport.

By other side, S4 and S5 showed lower levels of Fe and Mn in leaves. Between them, Fe was abundant in these substrates, but the uptake of Fe was repressed, especially in S4, probably due to the high pH and EC that percolated solutions showed. Interestingly, S5 presented the highest accumulation of B in leaves, being this substrate the one with less B content, pointing to a boosted uptake and transport of B in those plants. Although is commonly accepted

that boron transport is mainly by passive diffusion through the lipid bilayers (Dannel et al. 2002; Barrow and Hartemink 2023), some proteins belonging to the major intrinsic protein family (MIP) such as zmPIP1 or atPIP1.1b aquaporins have been reported to transport B (Dordas et al. 2000; Takano et al. 2006; Lopez-Zaplana et al. 2022). Taking into account the previous fact, and that plants cultivated on S5 showed the highest expression of PIPs, it suggests that S5 plants enhance B uptake at least partially by increasing their PIPs expressions.

In plant inflorescences, the mineral contents were in agreement with previous data. In general, inflorescences accumulated higher levels of nutrients in S1 and S3 plants, followed by S5 plants, and plants cultivated in S2 and S4 showed lower content in almost all nutrients, being Ca, Mg and Cu lower in S2 plants. All this data strongly points to water availability as main factor in nutrient uptake in both, vegetative and reproductive stages of cannabis.

Levels of CBD in inflorescences were also measured. It has been reported a positive correlation among plant growth and CBD content in hemp cultivars (Kakabouki et al. 2021), which was in correlation with our results. In this way, S3 and S1 showed highest levels of CBD, and better growth parameters, while S5 plants had the lowest inflorescence production, CBD content, and growth. This results were expected, as the plants that have optimal growth conditions can invest energy in the production of secondary metabolites while plants with slower development will tend to use their resources in growth. However, S4 plants showed the highest amount of CBD. Cannabinoids such as CBD are also synthetized by plants in response to some stresses such as drought (Caplan et al. 2019; Kostanda and Khatib 2022). Drought stress during the cultivation of medicinal plants should mainly result in increased biosynthesis of secondary metabolites (Kleinwächter and Selmar 2015). In a study carried out by Caplan et al. (2019) they evaluated the effects of drought on the dry weight of cannabis inflorescence and cannabinoid content by applying drought stress. They found that drought increased the yield of cannabinoids, with a 67% higher CBD yield than the control. Plants experiencing drought or flooding may adjust their morphology to optimize root water uptake while decreasing the rate of leaf photosynthesis, thus changing the production of growth and defense metabolites (Mundim and Pringle 2018). In this way, knowledge of the responses of the genotype under different conditions is required for the extraction of secondary metabolites from the cultivation of medicinal plants. This is because the abiotic factors considered ideal for the development of the plants may not be the same ones that promote an increase in the synthesis of secondary metabolites (Trancoso et al. 2022). The main difference between S4 and S5 is due to the presence of small amounts of perlite (10%) in S5, but both substrates mainly consist of coconut fiber. This different composition exclusively affects the AW and RW, which are higher in S5, while the S4 substrate has the lowest amount of AW among all the analyzed substrates. This, together with all physiological parameters, suggests that S4 plants suffered from high stress caused by the lack of water. Thus, it seems that S4 and S5 plants are dealing with water stress. S4 plants invest energy in growing their production of inflorescences and accumulating protective molecules such as CBD, while S5 plants invest in improving nutrients and water absorbance and mobilization. The AW in the substrate is the main factor responsible for the different behavior.

Results indicate that water relations were crucial in growth and development of cannabis pointing to a strong dependence of substrates available water. In this way, when the water available for plants was lower (S2, S4 and S5), transpiration of the plant was reduced and water transmembrane transport acquired great significant roll. In our results, almost all the PIPs (all PIP1s, *PIP2.2*, *PIP2.3* and *PIP2.7*) were overexpressed in leaves of plants grown on S5 compare with plants cultivated in all other substrates. These plants showed the lowest height, leaves and inflorescences dry weight, but interestingly, although S5 substrate showed the lowest levels of nutrients, S5 plants accumulated higher levels of macro and micronutrients in leaves, especially striking in the case of B, Mn and Zn, and S5 substrate presented high total water amounts (AW + RW) that could be still accessible for plants. These facts, together with higher expression of the PIPs, suggested that plants in S5 were induced to transport higher levels of water and nutrients to the leaves in order to stimulate vegetative growth under unfavorable conditions, and that PIPs were directly involved in this adaptation, usually by overexpression of PIPs (Li et al. 2015, 2021; Zhang et al. 2020; Yang et al. 2022b). By contrary, plants grown on S2 and S4 which had low access to water,

showed water preservation responses, with low transpiration levels and no changes in PIPs expression in contrast to the upregulation of PIPs in S5 plants. Plants had mechanisms to cope with dehydration, and one of them is the repression of PIP genes (Šurbanovski et al. 2013; Kelly et al. 2017). Curiously, the only PIP isoform that is higher in those S2 and S4 plants in comparison to S5 plants was *PIP2.1*, which was the most expressed aquaporin in our experiments. This aquaporin presented its higher gene expression values in S4 plants, followed by S2 and S3 plants. In that sense, it seems that the expression of *PIP2.1* has some relationship with the mobilization of water or nutrients towards the inflorescences, improving their production and somehow related to CBD accumulation, which are stimulated in S2, S3 and specially in S4 plants in comparison to plants grown in S5. Since PIP2 family has been reported to be involved in flowering stage in plants such as *Gentiana scabra* (Nemoto et al. 2022) or rose (Ma et al. 2008), the high expression of *PIP2.1* could be the key to promote flowering in cannabis.

Another interesting pattern was showed by *PIP1.4*. This aquaporin isoform had general low levels of expression but it was higher in S2, S4 and maximum in S5. It has been usually described that PIPs aquaporins were regulated in plants under water stress, with specific isoforms upregulated in leaves (Barzana et al. 2021), specifically many PIPs1 has been associated to water and gas exchange functions and stomatal behavior and ROS detoxification (Rodrigues et al. 2017). It seems that PIP1.4 could be playing a role in response to low water availability, counteracting the reduced transpiration or playing a role in mitigating the water stress situation.

Also in optimal conditions, aquaporins mediated water transport could make the difference in behavior between plants growth and development. In this way, S1 had highest transpiration rates but, however, S3 plants grew better than S1 plants. This can be partially ascribed to physical properties of the substrates, because S3 accumulates more water (AW + RW), presenting high water availability. In this sense, some aquaporin isoforms were highly expressed in leaves of S3 plants but not in S1 plants, pointing to the significance of the cell to cell pathway to cooperate with the apoplastic pathway to improve growth when high amount of water was still available in substrates. These isoforms were *PIP2.1* and *PIP2.3*, which has been described as important in leave tissues (Guerriero et al. 2019). *PIP2.3* was higher in S5 and S3 and seems to have a role in elongating stem and leaf tissues, been related to vegetative growth more than inflorescence production. All these data suggest that the aquaporins-mediated water transport in cannabis play key roles in both, optimal and water stress conditions.

Concluding remarks

Data obtained showed that AW in substrates was the main factor affecting cannabis growth. Substrates with peat in its composition accumulate more AW and apoplastic pathway promoted by transpiration seems to be clue to water and nutrients uptake in the plants grown in this substrates. By his side, substrates composed mainly by coconut fiber had lower AW giving rise to water stress. The plants grown on these substrates reduced the transpiration rate with consequences in water and nutrients uptake affecting vegetative growth and leaves development. However, the symplastic pathway related to aquaporins played key roles when sufficient water was still available in substrates in both cases: in plants grown under optimal water conditions, where the improved expression of some PIP isoforms made a difference in growth, production, and higher CBD concentration; and in stressed plants grown in coconut fiber, where PIPs promoted growth and nutrient accumulation if there was still some water available in the substrate. Specifically, PIP2.3 appears to be related to vegetative growth, while PIP2.1 is somehow involved in better inflorescence production, and PIP1.4 could be associated with the response to water stress. All the data suggest that the aquaporins-mediated water availability is crucial for an optimal use of the water present in the substrates. These findings contribute to determine the role of aquaporins in cannabis growth and the optimization of cultivation methods as an initial step for investigate in more detail the functionality and regulation of specific aquaporin isoforms, such as PIP2.3, PIP2.1, and PIP1.4, in cannabis plants. Determine their precise roles in water and nutrient uptake, especially under different environmental conditions and stress levels. This could involve molecular biology techniques like gene expression analysis and protein profiling. Also, experiments with different substrate blends, including variations in peat and coconut fiber ratios, will help to find the optimal mix that balances water retention and drainage for cannabis growth.

Acknowledgements The authors thank PROJAR for supplying the substrates.

Author contributions Conception and design: Gloria Bárzana and Micaela Carvajal. Material preparation, data collection, analysis and interpretation of data were performed by Nidia Ortiz-Delvasto, Pablo Garcia-Gomez and Gloria Bárzana. The first draft of the manuscript was written by Nidia Ortiz-Delvasto and Pablo Garcia-Gomez and all authors commented on previous versions of the manuscript. Final Draft: Gloria Bárzana. Supervision and validation: Gloria Bárzana and Micaela Carvajal. Funding acquisition: Micaela Carvajal. All authors read and approved the final manuscript.

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature. This research was funded by Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, CDTI with the 0 E-Missions Project (MIP-20201045).

Data availability The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Competing interests The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

References

Abad M, Fornes F, Carrión C et al (2005) Physical properties of various coconut coir dusts compared to peat. HortScience 40:2138–2144. https://doi.org/10.21273/hortsci.40.7.2138

Adesina I, Bhowmik A, Sharma H, Shahbazi A (2020) A review on the current state of knowledge of growing conditions, agronomic soil health practices and utilities of hemp in the United States. Agric 10:129. https://doi.org/10.3390/agriculture10040129

Ahmad R, Tehsin Z, Malik ST et al (2016) Phytoremediation Potential of Hemp (Cannabis sativa L.): Identification and Characterization of Heavy Metals Responsive Genes. Clean - Soil, Air, Water 44:195–201. https://doi.org/10.1002/clen.201500117

Ahmed SA, Ross SA, Slade D et al (2015) Minor oxygenated cannabinoids from high potency Cannabis sativa L. Phytochemistry 117:194–199. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.04.007

Anderson SL, Pearson B, Kjelgren R, Brym Z (2021) Response of essential oil hemp (Cannabis sativa L.) growth, biomass, and cannabinoid profiles to varying fertigation rates. PLoS ONE 16:1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252985

Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2007) How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in Phaseolus vulgaris under drought, cold or salinity stresses? New Phytol 173:808–816. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01961.x

Barrow NJ, Hartemink AE (2023) The effects of pH on nutrient availability depend on both soils and plants. Plant Soil. https://doi.org/10.1007/s11104-023-05960-5

Barzana G, Rios JJ, Lopez-Zaplana A et al (2021) Interrelations of nutrient and water transporters in plants under abiotic stress. Physiol Plant 171:595–619. https://doi.org/10.1111/ppl.13206

Berman P, Futoran K, Lewitus GM et al (2018) A new ESI-LC/MS approach for comprehensive metabolic profiling of phytocannabinoids in Cannabis. Sci Rep 8:1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-018-32651-4

Burgel L, Hartung J, Graeff-Hönninger S (2020) Impact of different growing substrates on growth, yield and cannabinoid content of two cannabis sativa L. genotypes in a pot culture. Horticulturae 6:1–14. https://doi.org/10.3390/horticulturae6040062

Caplan D, Dixon M, Zheng Y (2017) Optimal rate of organic fertilizer during the flowering stage for cannabis grown in two coir-based substrates. HortScience 52:1796–1803. https://doi.org/10.21273/HORTSCI12401-17

Caplan D, Dixon M, Zheng Y (2019) Increasing inflorescence dry weight and cannabinoid content in medical cannabis using controlled drought stress. HortScience 54:964–969. https://doi.org/10.21273/HORTSCI13510-18

Chen J, Huang Y, Li J et al (2022) Overexpression of the Eucommia ulmoides Aquaporin, EuPIP1;1, Promotes Leaf Growth, Flowering and Bolting, and Stress Tolerance in Arabidopsis. Int J Mol Sci 23:11794. https://doi.org/10.3390/ijms231911794

Cockson P, Landis H, Smith T et al (2019) Characterization of nutrient disorders of Cannabis sativa. Appl Sci 9:4432. https://doi.org/10.3390/app9204432

Coffman CB, Gentner WA (1975) Cannabinoid Profile and Elemental Uptake of Cannabis sativa L. as Influenced by Soil Characteristics 1. Agron J 67:491–497. https://doi.org/10.2134/agronj1975.00021962006700040010x

Dannel F, Pfeffer H, Römheld V (2002) Update on boron in higher plants - Uptake, primary translocation and compartmentation. Plant Biol 4:193–204. https://doi.org/10.1055/s-2002-25730

De Boodt M, Verdonck O, Cappaert I (1974) Method for measuring the waterrelease curve of organic substrates. Acta Hortic 2054–2063. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1974.37.20

Deguchi M, Potlakayala S, Spuhler Z et al (2021) Selection and validation of reference genes for normalization of qRT-PCR data to study the cannabinoid pathway genes in industrial hemp. PLoS ONE 16:1–17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260660

Dordas C, Chrispeels MJ, Brown PH (2000) Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. Plant Physiol 124:1349–1361. https://doi.org/10.1104/pp.124.3.1349

Golia EE, Angelaki A, Giannoulis KD et al (2021) Evaluation of soil properties, irrigation and solid waste application levels on cu and zn uptake by industrial hemp. Agron Res 19:92–99. https://doi.org/10.15159/AR.21.016

Guerriero G, Deshmukh R, Sonah H et al (2019) Identification of the aquaporin gene family in Cannabis sativa and evidence for the accumulation of silicon in its tissues. Plant Sci 287:110167. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110167

Higuchi K, Saito A (2022) Elucidation of efficient photosynthesis in plants with limited iron. Soil Sci Plant Nutr 68:505–513. https://doi.org/10.1080/00380768.2022.2106115

Holmes JE, Lung S, Collyer D, Punja ZK (2021) Variables Affecting Shoot Growth and Plantlet Recovery in Tissue Cultures of Drug-Type Cannabis sativa L. Front Plant Sci 12:732344. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.732344

Johnson L, Malone M, Paulson E et al (2023) Potency and safety analysis of hemp delta-9 products: the hemp vs. cannabis demarcation problem. J Cannabis Res 5:29. https://doi.org/10.1186/s42238-023-00197-6

Joseph T, Whitehead D, Turnbull MH (2014) Soil water availability influences the temperature response of photosynthesis and respiration in a grass and a woody shrub. Funct Plant Biol 41:468–481. https://doi.org/10.1071/FP13237

Kakabouki I, Kousta A, Folina A et al (2021) Effect of fertilization with urea and inhibitors on growth, yield and cbd concentration of hemp (Cannabis sativa l.). Sustain 13:1–15. https://doi.org/10.3390/su13042157

Kelly G, Sade N, Doron-Faigenboim A et al (2017) Sugar and hexokinase suppress expression of PIP aquaporins and reduce leaf hydraulics that preserves leaf water potential. Plant J 91:325–339. https://doi.org/10.1111/tpj.13568

Kim SA, Guerinot ML (2007) Mining iron: Iron uptake and transport in plants. FEBS Lett 581:2273–2280. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.043

Kleinwächter M, Selmar D (2015) New insights explain that drought stress enhances the quality of spice and medicinal plants: potential applications. Agron Sustain Dev 35:121–131. https://doi.org/10.1007/s13593-014-0260-3

Kostanda E, Khatib S (2022) Biotic stress caused by Tetranychus urticae mites elevates the quantity of secondary metabolites, cannabinoids and terpenes, in Cannabis sativa L. Ind Crops Prod 176:114331. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114331

Lefi E, Medrano H, Cifre J (2004) Water uptake dynamics, photosynthesis and water use efficiency in field-grown Medicago arborea and Medicago citrina under prolonged Mediterranean drought conditions. Ann Appl Biol 144:299–307. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2004.tb00345.x

Li J, Yu G, Sun X et al (2015) AcPIP2, a plasma membrane intrinsic protein from halophyte Atriplex canescens, enhances plant growth rate and abiotic stress tolerance when overexpressed in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Rep 34:1401–1415. https://doi.org/10.1007/s00299-015-1796-7

Li M, Li M, Li D et al (2021) Overexpression of the zygophyllum xanthoxylum aquaporin, zxpip1;3, promotes plant growth and stress tolerance. Int J Mol Sci 22:1–15. https://doi.org/10.3390/ijms22042112

Liu X, Fan Y, Long J et al (2013) Effects of soil water and nitrogen availability on photosynthesis and water use efficiency of Robinia pseudoacacia seedlings. J Environ Sci (china) 25:585–595. https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60081-3

Lopez-Zaplana A, Bárzana G, Ding L et al (2022) Aquaporins involvement in the regulation of melon (Cucumis melo L.) fruit cracking under different nutrient (Ca, B and Zn) treatments. Environ Exp Bot 201:104981. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.104981

Ma N, Xue J, Li Y et al (2008) Rh-PIP2;1, a rose aquaporin gene, is involved in ethylene-regulated petal expansion. Plant Physiol 148:894–907. https://doi.org/10.1104/pp.108.120154

Mejía PA, Ruíz-Zubiate JL, Correa-Bustos A et al (2022) Effects of Vermicompost Substrates and Coconut Fibers Used against the Background of Various Biofertilizers on the Yields of Cucumis melo L. and Solanum lycopersicum L. Horticulturae 8:445. https://doi.org/10.3390/horticulturae8050445

Mundim FM, Pringle EG (2018) Whole-plant metabolic allocation under water stress. Front Plant Sci 9:1–12. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00852

Navarrete C, García-Martín A, Rolland A et al (2021) Cannabidiol and other cannabinoids in demyelinating diseases. Int J Mol Sci 22:1–17. https://doi.org/10.3390/ijms22062992

Nemati R, Fortin J-P, Craig J, Donald S (2021) Growing Mediums for Medical Cannabis Production in North America. Agronomy 11(7):1366. https://doi.org/10.3390/agronomy11071366

Nemoto K, Niinae T, Goto F et al (2022) Calcium-dependent protein kinase 16 phosphorylates and activates the aquaporin PIP2;2 to regulate reversible flower opening in Gentiana scabra. Plant Cell 34:2652–2670. https://doi.org/10.1093/plcell/koac120

Ortiz-Delvasto N, Garcia-Ibañez P, Olmos-Ruiz R et al (2023) Substrate composition affects growth and physiological parameters of blueberry. Sci Hortic (Amsterdam) 308:111528. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111528

Pathak RK, Singh DB, Sharma H et al (2021) Calcium uptake and translocation in plants. Elsevier Inc

Pérez-Vázquez A, Hernández-Salinas G, Ávila-Reséndiz C et al (2013) Effect of the soil water content on Jatropha seedlings in a tropical climate. Int Agrophysics 27:351–357. https://doi.org/10.2478/intag-2013-0004

Ramakers C, Ruijter JM, Lekanne Deprez RH, Moorman AFM (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neurosci Lett 339:62–66. https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01423-4

Raviv M, Wallach R, Blom TJ (2004) The effect of physical properties of soilless media on plant performance

- A review. Acta Hortic 644:251–259. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.644.34
Raviv M, Lieth JH (2008) Soilless culture: Theory and practice. Elsevier. Amsterdam, pp. 248–253. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52975-6.X5001-1
Rodrigues O, Reshetnyak G, Grondin A et al (2017) Aquaporins facilitate hydrogen peroxide entry into guard cells to mediate ABA- and pathogen-triggered stomatal closure. Proc Natl Acad Sci U S A 114:9200–9205. https://doi.org/10.1073/pnas.1704754114
Rull V (2022) Origin, early expansion, domestication and anthropogenic diffusion of Cannabis, with emphasis on Europe and the Iberian Peninsula. Perspect Plant Ecol Evol Syst 55:125670. https://doi.org/10.1016/j.ppees.2022.125670
Sarkar AN, Wynjones RG (1982) Effect of rhizosphere pH on the availability and uptake of Fe, Mn and Zn. Plant Soil 66:361–372. https://doi.org/10.1007/BF02183802
Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nat Protoc 3:1101–1108. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73
Soong JL, Janssens IA, Grau O et al (2020) Soil properties explain tree growth and mortality, but not biomass, across phosphorus-depleted tropical forests. Sci Rep 10:1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-020-58913-8
Strzelczyk M, Lochynska M, Chudy M (2021) Systematics and Botanical Characteristics of Industrial Hemp Cannabis Sativa L. J Nat Fibers 00:1–23. https://doi.org/10.1080/15440478.2021.1889443
Šurbanovski N, Sargent DJ, Else MA et al (2013) Expression of Fragaria vesca PIP Aquaporins in Response to Drought Stress: PIP Down-Regulation Correlates with the Decline in Substrate Moisture Content. PLoS One 8:e74945. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074945
Takano J, Wada M, Ludewig U et al (2006) The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. Plant Cell 18:1498–1509. https://doi.org/10.1105/tpc.106.041640
Trancoso I, de Souza GAR, Dos Santos PR et al (2022) Cannabis sativa L.: Crop Management and Abiotic Factors That Affect Phytocannabinoid Production. Agronomy 12:1–30. https://doi.org/10.3390/agronomy12071492
Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy De N, Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Rock Mech Rock Eng 51:2747–2759. https://doi.org/10.1007/s00603-018-1496-z
Vargas-Tapia P, Castellanos-Ramos JZ, Sánchez-García P et al (2008) Caracterización Física, Química Y Biológica De Sustratos De Polvo De Coco. Rev Fitotec Mex 31:375. https://doi.org/10.35196/rfm.2008.4.375
Verdoucq L, Maurel C (2018) Plant Aquaporins. Advances in Botanical Research, 1st edn. Elsevier Ltd., pp 25–56
Yang X, Li J, Ji C et al (2022) Plant Physiology and Biochemistry tolerance and promotes flowering in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol Biochem 193:25–35
Yang X, Li J, Ji C et al (2022) Overexpression of an aquaporin gene EsPIP1;4 enhances abiotic stress tolerance and promotes flowering in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol Biochem 193:25–35. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.10.019
Yepes-Molina L, Bárzana G, Carvajal M (2020) Controversial regulation of gene expression and protein transduction of aquaporins under drought and salinity stress. Plants 9:1–18. https://doi.org/10.3390/plants9121662
Zerihun A, Chandravanshi BS, Debebe A, Mehari B (2015) Levels of selected metals in leaves of Cannabis sativa L. cultivated in Ethiopia. Springerplus 4:1–10. https://doi.org/10.1186/s40064-015-1145-x
Zhang J, Wen W, Li H et al (2020) Overexpression of an aquaporin gene PvPIP2;9 improved biomass yield, protein content, drought tolerance and water use efficiency in switchgrass (Panicum virgatum L.). GCB Bioenergy 12:979–991. https://doi.org/10.1111/gcbb.12751
Zhang J, Wan L, Igathinathane C et al (2021) Spatiotemporal heterogeneity of chlorophyll content and fluorescence response within rice (*Oryza sativa* L.) canopies under different nitrogen treatments. Front Plant Sci 12:1–13. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.645977
Zheng Y, Wang L, Dixon M (2007) An upper limit for elevated root zone dissolved oxygen concentration for tomato. Sci Hortic (amsterdam) 113:162–165. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.03.011
Zhu F, Ming R (2019) Global identification and expression analysis of pineapple aquaporins revealed their roles in CAM photosynthesis, boron uptake and fruit domestication. Euphytica 215:1–17. https://doi.org/10.1007/s10681-019-2451-0

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

CAPÍTULO

Optimización del cultivo de arándano y cannabis en sustratos sin suelo: Efecto del tipo de sustrato sobre el desarrollo y la calidad.

Capítulo II: ***Optimización del cultivo de arándano y cannabis en sustratos sin suelo: Efecto del tipo de sustrato sobre el desarrollo y la calidad.***

Introducción

La agricultura contemporánea enfrenta desafíos significativos relacionados con la sostenibilidad, la eficiencia en el uso de recursos y la necesidad de incrementar la productividad para satisfacer la creciente demanda alimentaria y de productos agrícolas especializados. En este contexto, los sistemas de cultivo sin suelo han emergido como una alternativa para reducir la aplicación de contaminantes al suelo y permitir una agricultura de precisión (Atzori et al., 2021). Por lo tanto, es esencial la determinación de las propiedades físicas y químicas de los sustratos para un uso eficaz, ya que estas condicionan el potencial productivo de las plantas al constituir el medio en el cual se desarrollan las raíces, influyendo en el crecimiento y desarrollo vegetal (Lemaire, 1995). En este sentido, materiales como la fibra de coco, la turba y la perlita, podrían ser buenos candidatos para cultivos como el arándano o el cannabis debido a su alta capacidad de retención de agua (Schreiber et al., 2021).

En este contexto, el presente estudio (que se corresponde con el Capítulo II de esta tesis doctoral) tuvo como objetivo principal evaluar el desarrollo, la respuesta fisiológica y la calidad de las plantas de arándano (Vaccinium corymbosum L.) y cannabis (Cannabis sativa L.) cultivadas en diferentes composiciones de sustrato. Para alcanzar este propósito, se estableció una relación entre las propiedades microbiológicas, químicas y físicas de los sustratos y variables clave como el crecimiento vegetal y el estado nutricional mineral de las plantas. Adicionalmente, se analizó la calidad de la producción en función de las respuesta fisiológica, considerando la influencia directa de la composición del sustrato sobre dichos procesos.

Materiales y métodos

2.1.1 Material vegetal y diseño experimental

El estudio se llevó a cabo en un invernadero cubierto de vidrio ubicado en la Sección Agroforestal de la Universidad de Murcia, España, bajo condiciones de ciclo lumínico con 14 horas promedio de luz y 10 h de oscuridad, con una temperatura controlada de 25 y 20°C (día/noche), y una humedad relativa de 70 y 80% (día/noche). Para el cultivo de arándano, se utilizaron plantas de Arándano de la variedad Legacy (*V. corymbosum L*) de aproximadamente 60cm de altura en macetas de un litro de capacidad. Este material fue proporcionado por una empresa de viveros (Viveros Arándanos el Cierron, Asturias, España). Las plantas se seleccionaron en base a la similitud en altura y se plantaron en macetas de 35L con 4 sustratos experimentales diferentes, compuestos por: 1. fibra de coco (70%) con turba (30%), 2. fibra de coco (90%) con chips de madera (10%), 3. fibra de coco (90%) y perlita (10%), 4. fibra de coco (100%). Las plantas se colocaron con una separación de 1,5 m entre hileras y 0,5 m entre macetas en la misma hilera. Las plantas (20 por sustrato) se cultivaron durante 5 meses, de mayo a septiembre. Los sustratos se lavaron con abundante agua destilada. El pH inicial se midió con un medidor de pH, pH-25 (Hach, Düsseldorf, Alemania) y la CE con un medidor de CE CM 35 (Hach, Düsseldorf, Alemania), a partir de 50 ml de lixiviado de planta. La cosecha de arándano se realizó de forma manual. La fruta recolectada de cada planta se pesó, se midió el tamaño con un pie de rey y se colocó en bolsas debidamente etiquetadas. Se almacenaron a -80°C, para su posterior análisis. La cosecha se realizó semanalmente durante 3 semanas en el mes de julio.

Por su parte, para el cultivo de cannabis, se utilizaron semillas de cáñamo (*Cannabis sativa L.*). Estas semillas fueron previamente hidratadas y germinadas en bandejas con vermiculita/perlita (en una proporción 50/50) a 28°C. Una vez germinadas, se transfirieron a macetas redondas de 9cm de diámetro con 50% de vermiculita y 50% de perlita, una planta por maceta. se llevaron a una cámara de cultivo de ambiente controlado con 70-85% de humedad relativa (HR), 25–30°C, 485 ppm de CO_2 y una radiación fotosintéticamente activa (PAR) de 400 ±

50µmol $m^{-2}s^{-1}$ con un fotoperiodo de 18h/6h (día/noche). Después de 30 días, el experimento se trasladó al mismo invernadero cubierto de vidrio ubicado en la Sección Agroforestal de la Universidad de Murcia, España. Para ello, las plantas se trasplantaron a macetas de 15 cm de diámetro con los 5 sustratos experimentales diferentes utilizados y descritos en el capítulo I: 1. fibra de coco (70%) con turba (30%), 2. fibra de coco (70%) con perlita (30%), 3. fibra de coco (60%) con turba (30%) y con perlita (10%), 4. fibra de coco (100%), 5. fibra de coco (90%) y perlita (10%). El diseño experimental fue completamente aleatorio con 6 plantas para cada uno de los 5 tipos de sustrato. La cosecha se realizó justo antes de iniciar el proceso de floración, ya que la producción de fibra de cáñamo no requiere de la producción floral, y se tuvo en cuenta el peso total de la planta para obtener la producción de biomasa útil.

El sistema de riego consistió en riego por goteo (4L/h), colocando un gotero por cada planta. Las plantas se regaron 2 veces al día, cada riego de 5 minutos durante los primeros meses, hasta el final del verano, luego se redujo el riego a 2 minutos. Se utilizó la solución universal de Hoagland y se ajustó el pH a 5,0 para arándano, mientas que se dejó a 5.5 para cannabis. La composición de la disolución fue de KNO_3 (6mM), $Ca(NO_3)_2$ (4mM), KH_2PO_4 (1mM), $MgSO_4$ (1mM), H_3BO_3 (25µM), $MnSO_4$ (2µM), $ZnSO_4$ (2µM), $CuSO_4$ (0.5µM), H_2MoO_4 (0.5µM) y Fe-EDDHA (20 µM). El experimento completo se realizó por triplicado.

2.1.2 Caracterización de los sustratos

Para el análisis físico de los sustratos de arándano, se utilizó un volumen de 20 L de cada sustrato. La granulometría se realizó en una muestra seca a 40 °C. El espacio poroso total (TPS), la densidad aparente (AD), densidad de partícula (PD) el agua disponible (AW), el agua de reserva (RW) y el agua no disponible (UAW) se determinaron de acuerdo con Hartmann et al., (1974). Para el análisis del contenido mineral, el sustrato previamente liofilizado y finamente molido de 5 muestras se digirió con HNO_3:$HClO_4$ (2:1). Los elementos se detectaron mediante un ensayo de plasma acoplado inductivamente (ICP) (Optima 3000,

PerkinElmer). A lo largo del experimento, el pH y la conductividad eléctrica (CE) en la solución drenada se midieron 4 veces. Se midió en el percolado de las disoluciones de drenaje mediante un medidor portátil de pH/CE CM 35 (Hach, Düsseldorf, Alemania). Además, con el fin de comprobar la presencia de enterobacterias, se prepararon disoluciones a partir de los diferentes sustratos y se realizaron diluciones seriadas para posteriormente realizar siembra en agar Mc.Conkey.

Para el caso del cultivo de cannabis, se tuvo en cuenta la caracterización de los sustratos realizada previamente en el capítulo I (Ortiz-Delvasto, Garcia-Gomez, et al., 2023).

2.1.3 Parámetros fisiológicos y bioquímicos

Se midió la altura para el cultivo de arándano y para el cultivo de cannabis de 6 plantas cultivadas en cada tipo de sustrato una vez por semana durante los experimentos. Esta medición se realizó utilizando una cinta métrica desde la base del tallo hasta el ápice de la planta.

La tasa de crecimiento relativo (RGR) se realizó seleccionando y marcando tres hojas por cada planta, a las que se les realizaron cuatro mediciones del área foliar tanto en plantas de arándano como de cannabis, con un intervalo de 8 días entre cada medición. Este procedimiento se realizó *in situ* dibujando el contorno de la hoja en una hoja de papel y posteriormente mediante el programa ImageJ se calculó el área, para posteriormente obtener la tasa de crecimiento relativa aplicando la siguiente ecuación: $RGR = (\ln A2 - \ln A1) / (t1 - t2)$

El contenido mineral se analizó en las hojas de plantas de cannabis, así como, en hojas y fruto (bayas) de plantas de arándano a partir de material seco. Las concentraciones minerales se determinaron mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) utilizando un equipo Thermo ICAP 6500 Duo (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Para cada muestra, se añadieron 200mg en un horno de microondas a un

tubo de 25ml con una mezcla de 4ml de HNO_3 (pureza del 68 %) y 1ml de H_2O_2 (pureza del 33%) para su posterior digestión. También se añadieron 300 ml de agua desionizada de alta pureza, 30ml de H_2O_2 (pureza del 33 %) y 2ml de H_2SO_4 (pureza del 98 %) en el reactor de teflón. El programa de digestión por calentamiento por microondas constó de 3 pasos: inicio a 20°C y 40 bar; aumentando 10 bar/minuto durante 30 min hasta 220°C; y manteniendo 220°C durante 20 min. Después de enfriar, la muestra mineralizada se transfirió a tubos de doble calibre de 10mL (microminerales) y 25mL (macrominerales) y el volumen se completó con agua desionizada de alta pureza. Se utilizó una solución estándar multimineral que contenía 31 minerales suministrada por SCP Science (Quebec, Canadá) para preparar estándares de calibración en agua desionizada de alta pureza. Para los análisis ICP-OES, se utilizaron dos muestras de control que contenían agua destilada de alta pureza y un estándar multimineral. Cada determinación de mineral se realizó a longitudes de onda específicas que oscilaron entre 167,1 y 670,8nm. La concentración de macro y microminerales se calculó según la fórmula "mg Kg^{-1} o μg Kg^{-1} (C x D) / W"; donde C era la concentración mineral, D era el factor de dilución y W era el peso de la muestra. Posteriormente estos resultados fueron calculados para ser expresados en mmol o μmol/Kg.

2.1.4 Parámetros calidad

2.1.4.1 Concentración de antocianinas

Para realizar la extracción, 100mg de arándanos, previamente liofilizados y molidos, se mezclaron en viales de 2mL con 1,5mL de disolvente de extracción metanol/H_2O/Ácido Fórmico (25:24:1) y se agitaron en vórtex. Posteriormente, las muestras se sónicaron durante 1h y luego se dejó a 4°C durante 24 h. Después, la mezcla se centrifugó a 13.500 rpm durante 15 min. Los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro PVDF de 0,22μm (Milipore, Beford, MA, EE. UU.). La composición en antocianinas se cuantificó mediante ESI-HPLC-DAD-MS/MS (Baenas et al., 2015), utilizando un HPLC Agilent 1100 acoplado a un detector de espectrómetro de masas (modelo G244GA) y equipado con un electrospray (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). Se utilizó cianidina-3-glucósido (Merck, Darmstadt, Alemania) como estándar. Teniendo en cuenta que, se ha

descrito que los ácidos clorogénicos influyen en la copigmentación en este tipo de bayas (Khalifa et al., 2021), también se cuantificó utilizando ácido clorogénico como estándar externo (Merck, Darmstadt, Alemania). La medición se realizó por triplicado.

2.1.4.2 Rendimiento del cáñamo (biomasa)

En el caso del cáñamo, lo que muestra calidad es la producción de fibra y por lo tanto se evalúa como biomasa total obtenida. Las plantas se cosecharon antes del proceso de floración, posteriormente, se lavaron durante la cosecha, para luego medir su peso fresco. El peso freso de la planta se midió con una balanza y se registró en gramos.

2.1.5 Análisis de datos

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 25.0.0.1. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y, posteriormente, mediante la prueba de comparaciones múltiples de Duncan. Se determinaron diferencias significativas entre los valores de cada determinación con un valor de $p \leq 0,05$, según la prueba de Duncan. Los valores se presentan como medias ± SE.

Resultados

2.1.6 Características físicas y químicas de los sustratos

Las propiedades físicas de los sustratos se muestran en la Tabla 3.1. En arándano, el sustrato compuesto por fibra de coco (100%) y el de fibra de coco (90%) con chips de madera (10%) presentaron mayor porosidad total que los sustratos compuestos por fibra de coco (70%) con turba (30%) y fibra de coco (90%) con perlita (10%). El sustrato fibra de coco (70%) con turba (30%) presentó el menor espacio aéreo y la máxima densidad aparente. En el caso de los parámetros del agua, el de fibra de coco (100%) mostró la mayor cantidad de agua disponible (AW), seguido del sustrato compuesto por fibra de coco (90%) con perlita (10%) y fibra de coco (70%) con turba (30%), mientras que el sustrato compuesto por fibra de coco (90%) con chips de madera (10%), acumuló los menores valores de disponibilidad de agua. El agua de reserva (RW) fue mayor en el sustrato compuesto por fibra de coco (100%) seguido de fibra de coco (90%) con perlita (10%), siendo de nuevo el sustrato compuesto por fibra de coco (90%) con chips de madera (10%) el sustrato con menor RW. El análisis de agua no disponible (UAW) mostró que el sustrato compuesto por fibra de coco (100%) tuvo el mayor valor de UAW. Por el contrario, el sustrato compuesto por fibra de coco (90%) con perlita (10%) y el sustrato compuesto por fibra de coco (90%) con chips de madera (10%), fueron los sustratos con menor UAW.

Tabla 3.1. *Propiedades físicas de los sustratos para el cultivo de arándano: Porosidad total, espacio aéreo, densidad aparente, agua disponible (AW), agua de reserva (RW) y, agua no disponible (UAW). Los valores corresponden a la media de 3 muestras ± SE. Las medias seguidas de letras diferentes presentaron diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).*

Sustratos cultivo arandano	Porosidad total (%)	Espacio aereo (%)	Densidad aparente (g cm-3)	AW (%)	RW (%)	UAW (%)
fibra de coco (70%) con turba (30%)	91,2 ± 0,07d	25 ± 0,11c	0,146 ± 0,001a	25,2 ± 0,24c	4,8 ± 0,09c	32,7 ± 0,63b
fibra de coco (90%) con chips de madera (10%)	99,2 ± 0,52a	37 ± 0,17a	0,106 ± 0,003c	12,3 ± 0,21d	4,1 ± 0,08d	26,2 ± 0,44d
fibra de coco (90%) con perlita (10%)	92,8 ± 0,41c	36 ± 0,63a	0,138 ± 0,002b	39,7 ± 0,17b	6,4 ± 0,08b	31,3 ± 0,72c
fibra de coco (100%)	96,6 ± 0,08b	32 ± 0,71b	0,089 ± 0,001d	43,6 ± 0,33a	7,5 ± 0,13a	34,5 ± 0,51a

Se analizaron el pH y la CE de la solución de riego percolada (Tabla 3.2). Para el cultivo de arándano, el sustrato compuesto por fibra de coco (100%) presentó los valores más altos de pH y CE, seguido del sustrato compuesto por fibra de coco (90%) con chips de madera (10%). Ambos presentaron valores significativamente más altos en comparación con los sustratos compuestos por fibra de coco (70%) con turba (30%) y sustrato compuesto por fibra de coco (90%) con perlita (10%).

Tabla 3.2. *El pH y la conductividad eléctrica de los sustratos para el cultivo de arándano y el cultivo de cannabis. Los valores corresponden a la media de 3 muestras ± SE. Las medias seguidas de letras diferentes presentaron diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).*

Sustrato	pH	CE
Sustratos para cultivo de arandano		
fibra de coco (70%) con turba (30%)	6,63 ± 0,03c	0,92 ± 0,08c
fibra de coco (90%) con chips de madera (10%)	7,28 ± 0,12a	1,37 ± 0,02b
fibra de coco (90%) con perlita (10%)	6,79 ± 0,02b	0,97 ± 0,03c
fibra de coco (100%)	7,41 ± 0,08a	3,48 ± 0,05a
Sustratos para cultivo de cannabis		
fibra de coco (70%) con turba (30%)	6,63 ± 0,03b	0,94 ± 0,03c
fibra de coco (70%) con perlita (30%)	6,55 ± 0,05b	0,94 ± 0,02c
fibra de coco (60%) con turba (30%) y con perlita (10%)	6,56 ± 0,02b	0,95 ± 0,05c
fibra de coco (100%)	7,76 ± 0,07a	2,31 ± 0,02a
fibra de coco (90%) y con perlita (10%)	7,68 ± 0,06a	1,49 ± 0,02a

Para el cultivo de cannabis, el sustrato compuesto por fibra de coco (100%), presentó los valores promedio más altos de pH y CE, seguido del sustrato compuesto por fibra de coco (90%) con perlita (10%). Ambos presentaron valores significativamente más altos que los compuestos por fibra de coco (70%) con turba (30%), fibra de coco (70%) con perlita (30%) y el sustrato compuesto por fibra de coco (60%) con turba (30%) y con perlita (10%). sin diferencias significativas entre ellos.

Tabla 3.3. *Crecimiento de enterobacterias de los sustratos sin tratamiento previo, para el cultivo de arándano y el cultivo de cannabis. Los resultados representados (-), señalan ausencia de enterobacterias y los resultados representados (+), señalan presencia de enterobacterias.*

Sustrato	Presencia	Ausencia
Sustratos para cultivo de arandano		
Fibra de coco (70%) con turba (30%)		(–)
Fibra de coco (90%) con chips madera (10%)		(–)
Fibra de coco (90%) con perlita (10%)		(–)
Fibra de coco (100%)		(–)
Sustratos para cultivo de cannabis		
Fibra de coco (70%) con turba (30%)		(–)
Fibra de coco (70%) con perlita (30%)	(+)	
Fibra de coco (60%), turba (30%) con perlita (10%)	(+)	
Fibra de coco (100%)		(–)
Fibra de coco (90%) con perlita (10%)		(–)

En relación con la presencia de enterobacterias, para los sustratos de cultivo de cannabis, se evidencio la presencia de enterobacterias en los sustratos compuestos por fibra de coco (70%) con perlita (30%) y fibra de coco (60%) con turba (30%) y con perlita (10%). Mientras que los sustratos para el cultivo de arándano no presentaron evidencia de enterobacterias.

Figura 3.1. *Análisis microbiológico de enterobacterias. Placas Petri con agar McConkey selectivo para enterobacterias. Presencia de enterobacterias (a). Ausencia de enterobacterias (b).*

Una vez sometidos los sustratos a proceso de esterilización, se comprobó la ausencia de enterobacterias para todos los sustratos.

El contenido de minerales presentes en los sustratos para el cultivo de arándano se presenta en la tabla 3.4. El sustrato compuesto por fibra de coco (70%) y turba (30%) presentó los valores más altos de Ca, K, Mg y P, seguido del sustrato compuesto por fibra de coco (90%) con chips de madera (10%). Por el contrario, el sustrato compuesto por fibra de coco (100%) mostró un contenido significativamente inferior en macronutrientes en relación con los demás sustratos. En contraste, el contenido de nitrógeno fue más elevado en el sustrato compuesto por fibra de coco (90%) y perlita (10%) seguido del sustrato compuesto por fibra de coco (100%). Por otro lado, el sustrato compuesto únicamente por fibra de coco (100%) presentó los valores más altos para micronutrientes como Cu, Mn, Fe y Zn. Mientras que el sustrato compuesto por fibra de coco (70%) con turba (30%) presento los valores más altos para B.

Tabla 3.4. *Análisis del contenido mineral en los sustratos del cultivo de arándano: (a). Macronutrientes y (b) micronutrientes en sustratos para el cultivo de arándano. Los valores corresponden a la media de 3 muestras ± SE. Las medias seguidas de letras diferentes presentaron diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).*

a. Macronutrientes sustratos Arandano (mmol/Kg DW)

Sustrato	Ca	K	Mg	P	N
fibra de coco (70%) con turba (30%)	176,261 ± 0,303a	685,743 ± 1,084a	97,281 ± 0,072a	26,089 ± 0,161a	176,405 ± 1,702b
fibra de coco (90%) con chips de madera (10%)	125,771 ± 0,141b	682,042 ± 0,133b	91,711 ± 2,961b	20,052 ± 0,455b	145,381 ± 2,521c
fibra de coco (90%) con perlita (10%)	45,533 ± 0,142c	526,711 ± 4,303c	50,103 ± 0,232c	18,571 ± 0,757c	307,236 ± 21,384a
fibra de coco (100%)	49,993 ± 1,907c	507,086 ± 0,387c	58,672 ± 2,781c	18,206 ± 1,037c	302,105 ± 11,497a

b. Micronutrientes sustratos Arandano (mmol/Kg DW)

Sustrato	B	Cu	Fe	Mn	Zn
fibra de coco (70%) con turba (30%)	8,067 ± 0,002a	0,119 ± 0,003a	2,136 ± 0,002d	2,536 ± 0,017b	0,812 ± 0,004b
fibra de coco (90%) con chips de madera (10%)	6,323 ± 0,009b	0,052 ± 0,003b	3,082 ± 0,002b	0,452 ± 0,162c	0,165 ± 0,001c
fibra de coco (90%) con perlita (10%)	2,946 ± 0,015c	0,041 ± 0,012c	7,214 ± 4,181c	0,346 ± 0,033c	0,136 ± 0,072c
fibra de coco (100%)	6,489 ± 0,007b	0,123 ± 0,002a	9,018 ± 3,790a	4,074 ± 0,036a	1,022 ± 0,003a

2.1.7 Mediciones fisiológicas

La altura de las plantas de arándano (Figura 3.2) cultivadas en los diferentes sustratos se midió al inicio y al final del experimento (después de 5 meses de crecimiento). Las plantas cultivadas en los sustratos no presentaron diferencias en

la altura, al inicio del experimento. Las plantas cultivadas en sustrato compuesto por fibra de coco (100%) fueron significativamente más altas en comparación con las demás plantas crecidas en los diferentes sustratos.

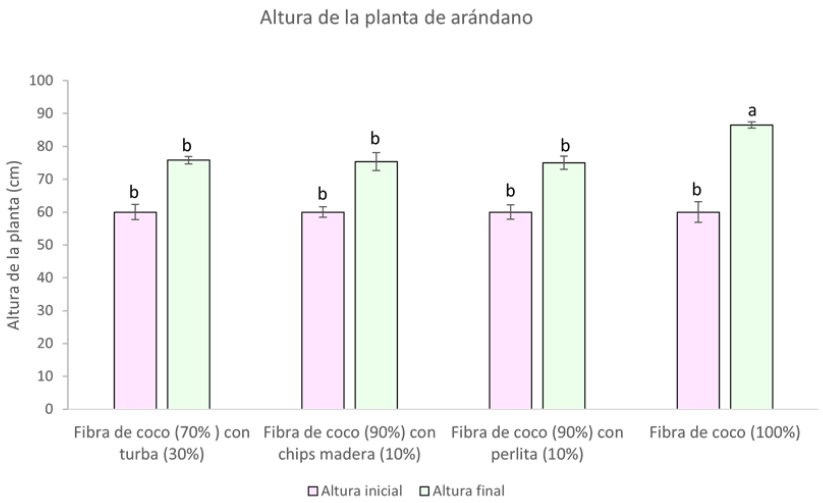


Figura 3.2. *Altura promedio de plantas de arándano cultivadas en diferentes sustratos medida durante el inicio y el final del experimento. La medida inicial y final se representan con un color diferente: medida de altura inicial, representada en color rosado y medida de altura final representado en color verde. Los valores muestran la media de 6 plantas ± SE. Las medias seguidas de letras diferentes resultaron significativamente diferentes según la prueba de Duncan (p ≤ 0,05).*

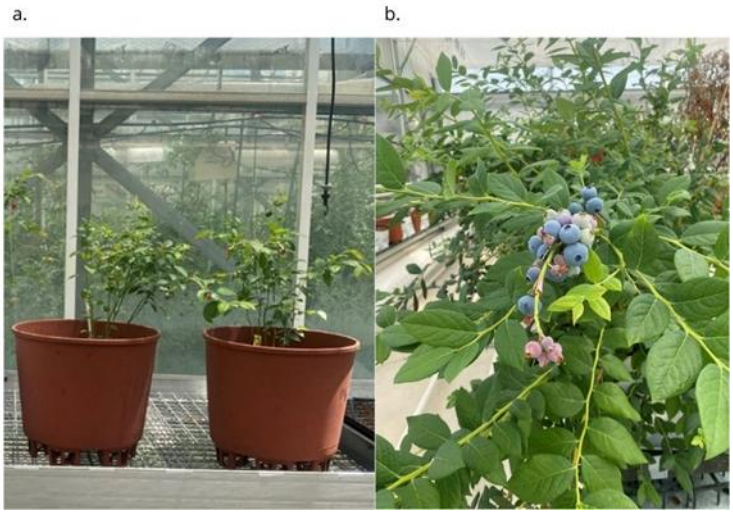


Figura 3.3. *Fotografías de las plantas de arándano, al inicio del experimento (a). y al final del experimento (b).*

La altura de las plantas de cannabis (Figura 3.4) cultivadas en los diferentes sustratos al final del experimento. Las plantas cultivadas en el sustrato compuesto por fibra de coco (60%) con turba (30%) y con perlita (10%), fueron significativamente más altas en comparación con todas las demás plantas. Las plantas cultivadas en sustrato compuesto por fibra de coco (70%) con turba (30%) y las plantas cultivadas en sustrato compuesto por fibra de coco (100%), fueron las segundas en altura de planta, pero no presentaron diferencias significativas entre ellas. Las plantas cultivadas en el sustrato compuesto por fibra de coco (90%) con perlita (10%) tuvieron la altura más baja.

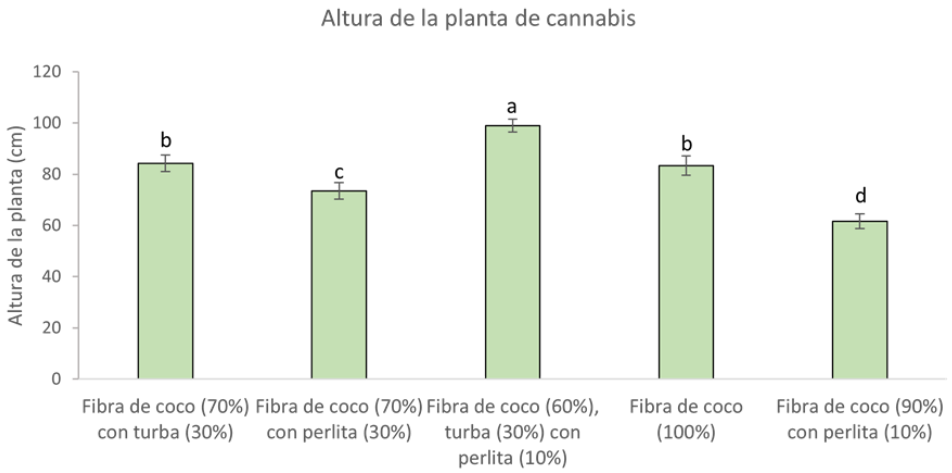


Figura 3.4. *Altura promedio de plantas de cannabis cultivadas en diferentes sustratos medida al final del experimento. Los valores muestran la media de 6 plantas ± SE. Las medias seguidas de letras diferentes resultaron significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).*

Figura 3.5. *Fotografías de las plantas de cannabis, al final inicio del experimento (a) y al final del experimento (b).*

La tasa de crecimiento relativo (RGR) en plantas de arándano (Figura 3.6) cultivadas en diferentes sustratos. Las plantas cultivadas en sustrato compuesto por fibra de coco (100%) presento mayor velocidad de crecimiento en relación con en relación con las demás plantas.

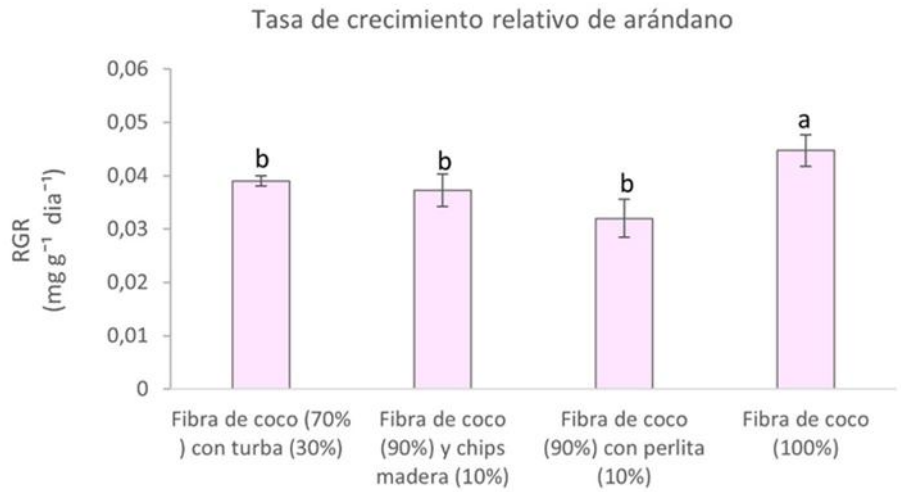


Figura 3.6. *Velocidad de crecimiento de plantas de arándano cultivadas en diferentes sustratos. Los valores muestran la media de 6 plantas ± SE. Las medias seguidas de letras diferentes resultaron significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).*

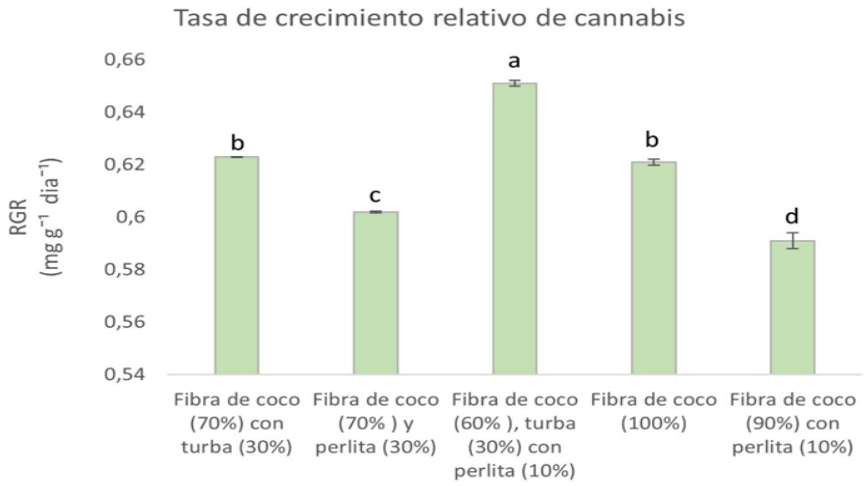


Figura 3.7. *Velocidad de crecimiento de plantas de cannabis cultivadas en diferentes sustratos. Los valores muestran la media de 6 plantas ± SE. Las medias*

seguidas de letras diferentes resultaron significativamente diferentes según la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).

La tasa de crecimiento relativo en plantas de cannabis (Figura 3.7), cultivadas en diferentes sustratos. Las plantas cultivadas en sustrato compuesto por Fibra de coco (60%), turba (30%) y perlita (10%) tuvieron la tasa más alta de crecimiento relativo, seguida de las plantas cultivadas en sustrato compuesto por fibra de coco (70%) y turba (30%) y las plantas cultivadas en sustrato compuesto por fibra de coco (100%). Las plantas cultivadas en sustrato compuesto por fibra de coco (90%) con perlita (10%), presentaron la menor velocidad de crecimiento en relación con en relación con las demás plantas.

2.1.8 Contenido de nutrientes

La tabla 3.5 muestra la concentración de nutrientes de las hojas de arándano cultivadas en diferentes sustratos. Las hojas de plantas cultivadas en sustrato compuesto por fibra de coco (70%) con turba (30%), presentaron el mayor contenido de Ca, mientras que las hojas de las plantas crecidas en fibra de coco (90%) y perlita (10%), tuvo los niveles más bajos. Igualmente, K también fue más alto en las hojas de plantas cultivadas en sustrato compuesto por fibra de coco (70%) con turba (30%), seguido de las hojas de plantas crecidas en fibra de coco (90%) con chips de madera (10%). Por el contrario, los valores de K en las cultivadas en sustrato compuesto por fibra de coco (70%) con perlita (10%) fueron significativamente más bajos. Las hojas de las plantas crecidas en sustrato compuesto por fibra de coco (100%), presentaron la mayor concentración de Mg, mientras que, las hojas de plantas crecidas en fibra de coco (70%) con turba (30%), presentaron los valores más bajos. Para N, las hojas de plantas crecidas en sustrato compuesto por fibra de coco (70%) con turba (30%), presentaron la concentración más alta, seguidas de hojas cultivadas en sustrato compuesto por fibra de coco (90%) con chips de madera (10%).

Respecto a los micronutrientes en hojas de arándano (tabla 3.5b), los niveles de B fueron más altos en el sustrato compuesto por fibra de coco (90%)

con perlita (10%), mientras que el más bajo se registró en las hojas de plantas crecidas en sustrato compuesto por fibra de coco (70%) con turba (30%). El Cu presento los niveles más altos en también en el sustrato fibra de coco (90%) con chips de madera (10%). El Fe presento los valores más elevados en hojas de plantas crecidas en el sustrato fibra de coco (90%) con chips de madera (10%) y en hojas de plantas crecidas en fibra de coco (90%) con perlita (10%). Por el contrario, las hojas de plantas cultivadas en sustrato compuesto por fibra de coco (70%) con turba (30%), presentaron los valores más bajos. El Mn presentó una mayor concentración en las hojas de plantas cultivadas en el sustrato compuesto por fibra de coco (70%) con turba (30%). El zinc (Zn) también mostró diferencias significativas, siendo más alto en las hojas de plantas cultivadas en fibra de coco (90%) con chips de madera (10%) y fibra de coco (90%) con perlita (10%).

Tabla 3.5. *Análisis del contenido mineral en hojas de arándano: (a). Contenido de macronutrientes foliares de arándano, (b). contenido de micronutrientes foliares de arándano. Los valores corresponden a la media de 3 muestras ± SE. Las medias seguidas de letras diferentes presentaron diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).*

a. Macronutrientes de la hoja de arandano (mmol/Kg DW)

Sustratos	Ca	K	Mg	P	N
fibra de coco (70%) con turba (30%)	123,03 ± 2,03a	688,15 ± 22,03a	27,42 ± 6,14b	64,58 ± 2,92b	1574,67 ± 58,39a
fibra de coco (90%) con chips de madera (10%)	118,92 ± 1,06ab	602,01 ± 30,11b	32,07 ± 3,07b	74,27 ± 4,14a	1337,41 ± 64,02b
fibra de coco (90%) con perlita (10%)	92,81 ± 0,76c	521,73 ± 13,76c	31,34 ± 1,06b	58,65 ± 5,52c	1133,16 ± 63,95c
fibra de coco (100%)	106,39 ± 2,02b	601,34 ± 25,72b	39,97 ± 1,49a	66,34 ± 6,34b	1298,68 ± 85,11b

b. Micronutrientes de la hoja de arandano (mmol/Kg DW)

Sustratos	B	Cu	Fe	Mn	Zn
fibra de coco (70%) con turba (30%)	1,089 ± 0,06c	0,629 ± 0.003b	2,893 ± 0,07d	0,461 ± 0,05a	0,419 ± 0,02c
fibra de coco (90%) con chips de madera (10%)	8,001 ± 0,75b	0,656 ± 0,002a	4,552 ± 0,06a	0,212 ± 0,02b	0,646 ± 0,02a
fibra de coco (90%) con perlita (10%)	9,608 ± 0,88a	0,634 ± 0,004b	3,555 ± 0,04b	0,137 ± 0,03c	0,627 ± 0,01a
fibra de coco (100%)	7,769 ± 0,31b	0,602 ± 0,001c	3,203 ± 0,01c	0,261 ± 0,04b	0,504 ± 0,02b

2.1.9 Concentración de antocianinas

Las antocianinas totales presentes en los arándanos se muestran en la Figura 3.8. Se detectaron seis tipos diferentes de antocianinas por ESI-HPLC-MS/MS; peonidina-3-galactósido (P3Gal), malvidina-3-galactósido (M3Gal), petunidina-3-galactósido (Pt3Gal), delfinidina-3-galactósido (D3Gal), delfinidina-3-arabinósido (D3Ara), y delfinidina-5-arabinósido (D5Ara). Se encontraron

concentraciones significativas más altas para delfinidina-3-galactósido y malvidina-3-galactósido para todos los sustratos. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre sustratos para cada una de las moléculas analizadas ($p \leq 0,05$). Además, se midió la presencia de ácido clorogénico (CGA), pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre sustratos ($p \leq 0,05$).

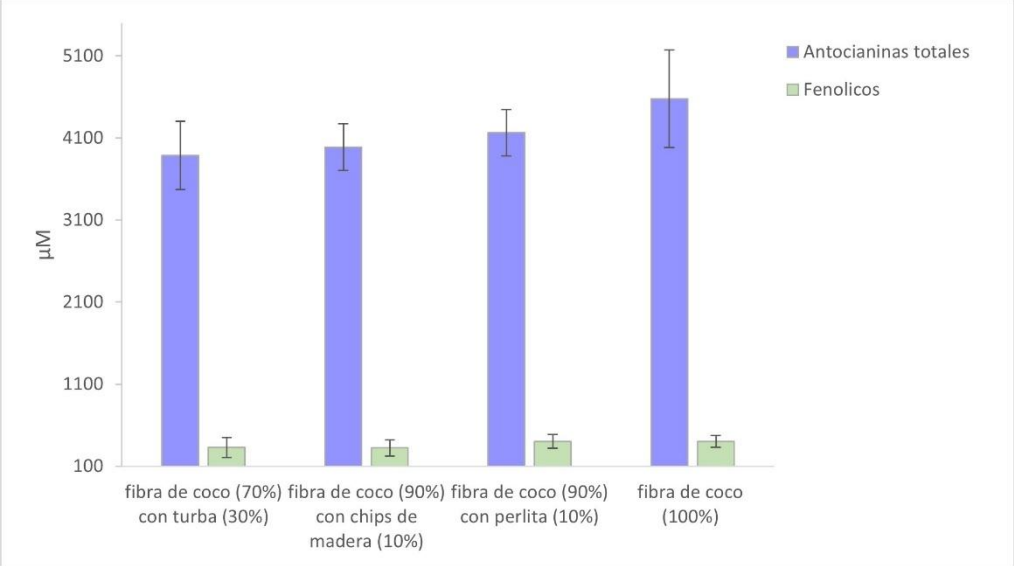


Figura 3.8. *Antocianinas totales presentes en arándanos, así como, fenólicos, como el ácido clorogénico (CGA). Las barras indican la media ± SE. La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas en cada compuesto al comparar los sustratos, según la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).*

2.1.10 Biomasa del cannabis

La biomasa de la planta de cannabis en diferentes mezclas de sustratos se muestra en la Tabla 3.6. Las plantas de cannabis cultivadas en sustrato compuesto por fibra de coco (60%) con turba (30%) y con perlita (10%) acumularon mayor biomasa, seguido de las plantas cultivadas en sustrato compuesto por fibra de coco (70%) con turba (30%) y las plantas cultivadas en sustrato compuesto por fibra de coco (100%). Por el contrario, las plantas crecidas en sustrato compuesto por fibra de coco (90%) con perlita (10%) fueron las que acumularon menor biomasa.

Tabla 3.6. *Peso fresco (FW) promedio de las plantas cultivadas en los diferentes sustratos. Los valores corresponden a la media de 3 muestras ± SE. Las medias seguidas de letras diferentes presentaron diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$).*

Sustratos	FW (g planta^{-1})
fibra de coco (70%) con turba (30%)	57,40 ± 1,03b
fibra de coco (70%) con perlita (30%)	37,04 ± 1,68c
fibra de coco (60%) con turba (30%) y con perlita (10%)	61,28 ± 1,97a
fibra de coco (100%)	55,28 ± 1,31b
fibra de coco (90%) y con perlita (10%)	31,69 ± 1,42d

Discusión

Los resultados obtenidos destacan la influencia significativa de la composición del sustrato en las propiedades físicas y en la dinámica del agua disponible para el cultivo de arándano. En particular, los sustratos compuestos exclusivamente por fibra de coco o con una pequeña adición de chips de madera (10%) mostraron mayor porosidad total, lo que coincide con observaciones previas que atribuyen a la estructura fibrosa y la baja densidad de la fibra de coco una alta capacidad de aireación y drenaje (Jahromi et al., 2020; Vinícius et al., 2014). La menor porosidad observada en el sustrato con turba puede relacionarse con la mayor compactación y densidad aparente del material, lo que a su vez reduce el espacio aéreo, una variable crítica para el desarrollo radicular en especies sensibles como el arándano (Jasik et al., 2023). En cuanto a los parámetros hídricos, el sustrato de fibra de coco al 100% presentó la mayor cantidad de agua disponible (AW) y agua de reserva (RW), lo que sugiere una elevada capacidad de retención de agua útil, esencial en sistemas de cultivo sin suelo con fertirrigación frecuente (Abad et al., 2001). Por el contrario, la incorporación de chips de madera redujo significativamente la disponibilidad hídrica, probablemente debido a su menor capacidad de retención de agua y mayor proporción de macroporos (Caron et al., 1999). La mayor fracción de agua no disponible (UAW) observada en el sustrato de fibra de coco pura podría estar relacionada con la presencia de microporos que retienen el agua con fuerzas superiores a la capacidad de absorción de las raíces, un aspecto ya señalado en estudios anteriores (Raviv et al., 2008).

El análisis de los macronutrientes y micronutrientes en diferentes sustratos para el cultivo de arándano revelo diferencias significativas que pueden influir en el desarrollo y producción de la planta. Por su parte, el sustrato de fibra de coco (90%) con chips de madera (10%) presentó niveles intermedios de nutrientes, lo que podría sugerir un balance menos favorable para cultivos exigentes como el arándano, dado que tanto los macronutrientes como los micronutrientes se vieron reducidos respecto a las demás mezclas. Por el contrario, el sustrato compuesto de fibra de coco (70%) con turba (30%) presentó las concentraciones más altas de calcio, potasio, magnesio y fósforo, nutrientes esenciales en procesos como la

fotosíntesis y la regulación del potencial osmótico de las células vegetales, así como, para el crecimiento vegetativo y el desarrollo radicular (Naeem et al., 2020). Además, mostró niveles elevados de boro y cobre, micronutrientes clave para la división celular y la formación de nuevas estructuras vegetativas. Sin embargo, su contenido de nitrógeno fue menor en comparación con otros sustratos. Por su parte, el sustrato compuesto por fibra de coco (90%) con perlita (10%) y el sustrato compuesto por fibra de coco (100%) destacaron por sus altos niveles de nitrógeno, crucial para la síntesis de proteínas y el crecimiento de brotes jóvenes. Además, la fibra de coco (100%) mostró concentraciones elevadas de hierro, manganeso y zinc, micronutrientes esenciales para procesos de fotosíntesis y defensa antioxidante. En este sentido, en un ensayo de Gómez-Bellot et al., (2020), utilizaron sustrato compuesto por fibra de coco para plantas de tomate con el fin de evaluar sus efectos beneficiosos al aplicar agua salina en invernadero, y se observó que la alta capacidad de retención de agua de la fibra de coco aumentó la disponibilidad de agua y nutrientes, mejorando parámetros fisiológicos como el potencial hídrico foliar, el intercambio gaseoso, la fluorescencia de clorofila y el tamaño y peso del fruto. De igual forma, de entre todos los sustratos testados en este estudio, el sustrato compuesto por fibra de coco (100%) fue el que promovió un mayor crecimiento en altura y velocidad de crecimiento en arándano, acompañado de una mayor retención de agua fácilmente disponible (AW) y agua de reserva (RW). Estos factores coinciden con resultados de estudios previos (Ortiz-Delvasto et al., 2023; Retamales et al., 2018), quienes indican que el arándano requiere un entorno con buena aireación radicular, pero con alta capacidad de retención hídrica, debido a su sistema radicular superficial y poco eficiente en la exploración del sustrato. En relación con el pH y la CE, en nuestros experimentos con arándano, el sustrato compuesto por fibra de coco (100%), presentó un pH y una conductividad eléctrica (CE) más altos al inicio del experimento en comparación con los demás sustratos. Del mismo modo, al aumentar la relación NH_4^+/NO_3^- en el fertilizante aplicado podría haberse reducido el pH, pero el efecto depende de la composición del sustrato (Bar-Tal et al., 2001). Por tanto, en nuestros ensayos, se corrigió el pH aplicando ácido clorhídrico (0.001 N) a la solución nutritiva, y, además, se redujo la CE mediante un lavado previo del sustrato. En consecuencia, los bajos valores de pH hallados

en el sustrato compuesto por fibra de coco (70%) con turba (30%) se debieron a la cantidad de turba presente. Aunque se ha informado que cuando se aplica solo NO_3^- al arándano, la absorción de N se reduce (Poonnachit et al., 2004), nuestras plantas recibieron la misma solución nutritiva. Por tanto, los resultados deben atribuirse a la composición del sustrato. En investigaciones previas se observó que la adición de diferentes cantidades de turba disminuye el pH y la CE de los suelos (Lee et al., 2021). También se ha reportado que la salinidad varía considerablemente según la fuente de fibra de coco, lo que puede convertirse en un factor limitante cuando esta se usa como sustrato principal (Konduru et al., 1999). Sin embargo, los medios de cultivo que contienen fibra de coco pueden proporcionar condiciones ideales en la rizosfera para el cultivo de arándanos si se controla la salinidad durante el trasplante, permitiendo picos de crecimiento radicular y foliar entre 0,10 y 0,50 $dS \cdot m^{-1}$ (Heller et al., 2022).

Contrariamente a lo que observamos en arándano, y en relación con el capítulo I, en el cultivo de cannabis, el sustrato que combinó fibra de coco (60%) con turba (30%) y perlita (10%), reflejó un equilibrio ideal entre aireación y disponibilidad de agua, presentando alto contenido de agua disponible (AW), agua no disponible, (UAW) y agua de reserva (RW), proporcionando las condiciones adecuadas para maximizar tanto la altura de planta como la tasa de crecimiento relativo (RGR) del cannabis en invernadero de manera similar a como observamos en cámaras de cultivo en el capítulo anterior. Adicionalmente, el sustrato compuesto por fibra de coco (70%) con turba (30%), que tenía abundante agua disponible (AW), exhibió características favorables para el crecimiento del cannabis. Ambos sustratos (fibra de coco (60%) con turba (30%) y con perlita (10%) y fibra de coco (70%) con turba (30%) compartían propiedades físicas en coherencia con investigaciones realizadas por Caplan et al., (2017a), quienes destacaron que cannabis responde favorablemente a sustratos con alta porosidad total, buena capacidad de drenaje y moderada retención hídrica. También, se ha observado que, el pH del sustrato afecta directamente la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera y la absorción de nutrientes por las plantas, lo que sugiere que la relación aireación/retención de agua ideal para cada especie depende del

sistema radicular (Hancock et al., 2012). Esto se demuestra en las distintas preferencias específicas del cannabis frente al arándano.

En términos microbiológicos, el cultivo de cannabis presentó colonias de enterobacterias en algunos sustratos sin tratamiento, mientras que en arándano no se detectó crecimiento. Teniendo en cuenta que este análisis se realizó antes de plantas sobre los sustratos, esta diferencia podría deberse tanto al origen del sustrato como a la composición química que genera ambientes más o menos favorables para la proliferación microbiana (Bonanomi et al., 2020). Tras la esterilización, la ausencia de enterobacterias fue total, confirmando la efectividad del tratamiento.

Estudios previos han señalado que la turba puede incrementar la disponibilidad de macronutrientes como N, P y Mg, además de reducir el pH, lo que mejora la solubilidad de varios micronutrientes esenciales (Prasad et al., 2020). En este sentido, aunque el sustrato compuesto por fibra de coco (70%) con turba (30%) para el cultivo de arándano, no fue el que promovió mayor crecimiento en biomasa, sí destacó por inducir mayores concentraciones de nutrientes como Ca, K, Mg y P en el tejido foliar, así como, de micronutrientes como B, Cu, Mn y Zn. Sin embargo, en el análisis del percolado después del trasplante se observó que el sustrato compuesto por fibra de coco (100%), tenía mayor capacidad de retención de minerales, como se evidencio en ensayos anteriores (Ortiz-Delvasto et al., 2023). El Ca y el Mg son retenidos (adsorbidos) por el sustrato, por lo que no se lixivian fácilmente y permanecen disponibles para la planta durante largos periodos (Cabrera, 1999). Además, Dependiendo de la capacidad de intercambio catiónico del sustrato, los micronutrientes se retienen generalmente con fuerza, cubriendo las necesidades del cultivo por largos periodos (Cabrera, 2004). Un ensayo en plantas de arándano con diferentes mezclas de sustrato evaluó su idoneidad en producción en contenedores, encontrando que la eficiencia de absorción de P, K y Mg difería entre las plantas cultivadas en turba y fibra de coco. También, encontraron que, en turba la concentración en el drenaje estaba relacionada con la concentración inicial de nutrientes antes de la siembra, proporcionando mayores concentraciones de Mg y

Fe en turba, y mayores concentraciones de P y K en fibra de coco (Kingston et al., 2020). Estos resultados difieren de los obtenidos en nuestro experimento, ya que el sustrato compuesto por fibra de coco (100%) presentó valores más altos de N y Fe. Por tanto, la composición de los sustratos dependería del origen (Atzori et al., 2021), y se debería realizar un análisis para adaptar el protocolo de fertiirrigación a cada tipo de sustrato concreto.

Para el cultivo de cannabis, sin embargo, la presencia de turba sí afectó al contenido y disponibilidad de algunos nutrientes. Tal cómo se evidencia en el capítulo I, el sustrato compuesto por fibra de coco (60%) con turba (30%) y con perlita (10%), mostró altas concentraciones de nutrientes como P, Cu, Fe y Mn que se tradujo en un aumento de los mismos en las hojas. A pesar de que la fibra de coco pura proporcionó un medio bien aireado, a diferencia del sustrato fibra de coco (100%) para el cultivo de arándano, este sustrato fibra de coco (100%) para cannabis tenía diferencias en la granulometría, lo que posiblemente pudo influir en su baja retención de agua disponible y agua de reserva que afectó negativamente la conductancia estomática y la acumulación de nutrientes, limitando el crecimiento en comparación con la mezcla con turba y perlita.

En relación con la calidad del arándano, el análisis del contenido de antocianinas no mostró diferencias significativas entre los tratamientos. La dificultad para identificar un factor directo que afecte la biosíntesis de estas biomoléculas puede deberse a la influencia de diversos factores, como el balance carbono/nitrógeno (Heimler et al., 2017) o la presencia de un microbioma en el suelo (Yu et al., 2020). Además, las antocianinas, como parte del metabolismo secundario de las plantas, cumplen principalmente funciones de defensa frente a agentes externos, tanto bióticos como abióticos (Pervaiz et al., 2017). Sin embargo, en condiciones controladas, como aquellas que implican el uso de fertilizantes o sustratos de composición fija, la concentración de antocianinas suele mantenerse estable o incluso, reducirse (Garcia-Ibañez et al., 2020). Esta estabilidad podría explicarse por la menor presencia de factores estresantes que normalmente inducen su síntesis. Adicionalmente, otros estudios han evidenciado la diversidad y complejidad de los mecanismos mediante los cuales distintos

sustratos pueden inducir el metabolismo secundario del arándano (Yang et al., 2025; Yang et al., 2022). En este sentido, los sustratos evaluados en el presente trabajo no provocaron una reducción en las concentraciones de antocianinas en los frutos de arándano, lo cual resulta favorable para conservar su valor nutricional en aplicaciones de producción industrial.

Por su parte, el rendimiento del cáñamo evidencio que, el sustrato compuesto por fibra de coco (60%) con turba (30%) y perlita (10%) resultó en la mayor producción de biomasa, sugiriendo que esta combinación proporciona condiciones óptimas para el crecimiento del cáñamo. Este sustrato probablemente logró un adecuado balance entre retención de humedad, aireación y disponibilidad de nutrientes, factores críticos para el rápido desarrollo vegetativo del cáñamo (Amaducci et al., 2015). Además, el sustrato compuesto por fibra de coco (70%) con turba (30%) también favoreció la producción de biomasa, lo que refuerza la idea de que la fibra de coco, junto con materiales en proporciones ideales, es un componente efectivo para sustratos en cultivos de rápido crecimiento como el cáñamo (Linger et al., 2002). En contraste, las mezclas que incorporaron perlita en mayores proporciones (fibra de coco 70% con perlita 30% y fibra de coco 90% con perlita 10%) mostraron la menor producción de biomasa. Aunque la perlita mejora la aireación del sustrato, su baja capacidad para retener agua y nutrientes puede haber limitado el crecimiento del cáñamo, que requiere altos niveles de nitrógeno y potasio durante su fase vegetativa (Campiglia et al., 2017). Estos resultados indican que el cáñamo se beneficia de un sustrato equilibrado que no sólo proporcione una adecuada aireación, sino también suficiente retención de agua y nutrientes, condiciones que fueron mejor satisfechas por las mezclas que incluyeron turba. En este sentido, ajustar las proporciones de fibra de coco, turba y perlita puede ser una estrategia clave para optimizar el rendimiento de biomasa en cultivos comerciales de cáñamo.

Por lo tanto, la evaluación comparativa del comportamiento fisiológico, nutricional y productivo de *Vaccinium corymbosum L.* y *Cannabis sativa L.* en distintos sustratos sin suelo demuestra que la respuesta de cada especie está estrechamente relacionada con determinadas propiedades físico-químicas del

sustrato, reflejando necesidades específicas en cuanto a aireación, retención de agua y disponibilidad de nutrientes. Mientras que el arándano mostró un crecimiento óptimo en sustratos compuestos exclusivamente por fibra de coco, el cannabis alcanzó su máximo rendimiento en sustratos mixtos con proporciones equilibradas de fibra de coco, turba y perlita. Estas diferencias se manifestaron no solo en variables de crecimiento y absorción mineral, sino también en parámetros fisiológicos, así como en la acumulación de metabolitos secundarios, donde el arándano mantuvo estables sus compuestos bioactivos y el cannabis incrementó su biomasa. En conjunto, los resultados destacan la importancia de seleccionar sustratos estudiando las particularidades fisiológicas y de desarrollo de cada cultivo para optimizar tanto el rendimiento y como la calidad.

CAPÍTULO III

Elevated carbon dioxide and substrate composition affect growth, nutrient uptake, and water use efficiency in blueberry cultivation under greenhouse.

Capítulo III: Elevated carbon dioxide and substrate composition affect growth, nutrient uptake, and water use efficiency in blueberry cultivation under greenhouse.

Nidia Ortiz-Delvasto and Micaela Carvajal*
Journal of plant nutrition, 10 March 2025
DOI: 10.1080/01904167.2025.2470388

Blueberries (Vaccinium corymbosum L.) are a high-value crop with growing demand worldwide due to their nutritional and health benefits. Optimizing their cultivation under controlled environmental conditions as the use of supplemental carbon dioxide (CO2), offers a promising avenue to enhance growth, yield, and resource use efficiency. However, the interaction between elevated CO2 levels and substrate composition on physiological parameters and nutrient dynamics in blueberry plants remains underexplored. Therefore, the objective of the present study was to investigate CO2 supplementation in the growth and production of blueberries under controlled temperature, humidity and irrigation conditions in a greenhouse with different substrate composition. Physiological parameters as gas exchange, mineral composition, production, water use efficiency (WUE) and nutrient use efficiency (NUE), as well as nitrite and nitrate concentration were determined in blueberry plants grown in 3 substrates with different physical-chemical characteristics. As a result, it was found that CO2 (1000 ppm) positively influenced the development of blueberry plants in all substrates, increasing the speed of growth and production. The plants grown in the experimental substrates S2 (100% coconut fibre) or S3 (90% coconut fibre and 10% perlite) under elevated CO2 conditions presented higher the photosynthetic rates. This result in relation to S1 (70% coconut fibre coconut and 30% peat) attributed to the composition (higher percentage of coconut fibre) of the substrate. However, S1 or S3 presented higher WUE and NUE under elevated CO2 conditions, increase water use and carbon assimilation to a greater extent than S2. Elevated CO2 failed to rise in the concentration of macronutrients and micronutrients in blueberry leaf and fruit grown in all substrates. However, plants

grown in S2 have a low nitrogen absorption capacity and a low adaptation to assimilate nitrogen. Therefore, the results indicate that the addition of perlite in S3 followed by peat in S1 were more suitable than S2 under elevated CO2 conditions, since the plants were able to absorb nitrogen and water more effectively providing higher yield in the S3.

Journal of Plant Nutrition

ISSN: 0190-4167 (Print) 1532-4087 (Online) Journal homepage: www.tandfonline.com/journals/lpla20

Elevated carbon dioxide and substrate composition affect growth, nutrient uptake, and water use efficiency in blueberry cultivation under greenhouse

Nidia Ortiz-Delvasto & Micaela Carvajal

To cite this article: Nidia Ortiz-Delvasto & Micaela Carvajal (10 Mar 2025): Elevated carbon dioxide and substrate composition affect growth, nutrient uptake, and water use efficiency in blueberry cultivation under greenhouse, Journal of Plant Nutrition, DOI: 10.1080/01904167.2025.2470388

To link to this article: https://doi.org/10.1080/01904167.2025.2470388

© 2025 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC

Published online: 10 Mar 2025.

Submit your article to this journal

Article views: 456

View related articles

View Crossmark data

Full Terms & Conditions of access and use can be found at https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=lpla20

JOURNAL OF PLANT NUTRITION
https://doi.org/10.1080/01904167.2025.2470388

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

OPEN ACCESS Check for updates

Elevated carbon dioxide and substrate composition affect growth, nutrient uptake, and water use efficiency in blueberry cultivation under greenhouse

Nidia Ortiz-Delvasto and Micaela Carvajal

Aquaporins Group. Plant Nutrition Department, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS, CSIC), Murcia, Spain

ABSTRACT

Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) are a valuable crop with growing demand due to their nutritional and health benefits. Optimizing their cultivation under controlled environmental conditions as the use of supplemental carbon dioxide (CO_2), offers a promising avenue to enhance growth. However, the interaction between elevated CO_2 levels and substrate composition on physiological parameters and nutrient dynamics in blueberry plants remains underexplored. Therefore, the objective of the present study was to investigate CO_2 supplementation in the growth and production under controlled conditions in a greenhouse with different substrate composition. Physiological parameters, mineral composition, production, water use efficiency (WUE), nutrient use efficiency (NUE), and nitrite and nitrate concentration were determined in plants grown in 3 substrates with different physical-chemical characteristics. Results showed that CO_2 (1000 ppm) positively influenced the growth and production of blueberry. The plants grown in the S2 (100% coconut fiber) or S3 (90% coconut fiber and 10% perlite) under elevated CO_2 presented higher the photosynthetic rates. This result in relation to S1 (70% coconut fiber and 30% peat) attributed to the composition of the substrate. However, S1 or S3 presented higher WUE and NUE under elevated CO_2, increase water use and carbon assimilation. Elevated CO_2 did not increase macronutrients and micronutrients concentration in leaf and fruit. However, plants grown in S2 have a low nitrogen absorption and adaptation to assimilate. Therefore, the results indicate that the addition of perlite in S3 followed by peat in S1 were more suitable than S2 under elevated CO_2, since the plants were able to absorb nitrogen and water more effectively providing higher yield in the S3.

ARTICLE HISTORY
Received 22 March 2024
Accepted 12 February 2025

KEYWORDS
Greenhouses; mineral nutrition; nitrogen assimilation; substrate physical properties; water uptake

Introduction

The impact of increased CO_2 levels on enhancing crop growth has been widely reported (Shaheen, Mustafa, and Ulfat. 2022; Van der Kooi et al. 2016; Bishop, Leakey, and Ainsworth 2014; Yang et al. 2022). This phenomenon has been applied in commercial greenhouse farming after scientific research using a variety of CO_2 enrichment methods, including greenhouses, growth chambers, and gradient tunnels (Medina et al. 2016; Shanmugam et al. 2013; Wei et al. 2018; Kimball et al. 2007). Initially studies reported by Kimball (1983) revealed an average 33%

CONTACT Micaela Carvajal mcarvaja@cebas.csic.es

© 2025 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.

boost in agricultural yield through CO_2 enrichment. The knowledge gathered from later experiments revealed that stimulation of photosynthetic rate, increasing crop yield and reduction of transpiration rate occurred at high CO_2 (Liu et al. 2019; Shaheen, Mustafa, and Ulfat. 2022; Han et al. 2023). Considering that CO_2 is key to photosynthesis, CO_2 enrichment is a widely accepted technique to improve photosynthesis, thereby increasing yield and commercial income (Pan et al. 2019; Curtis and Wang 1998; Jacotot et al. 2018; Han et al. 2023).

Also, it has been observed that high concentrations of CO_2 can increase tomato biomass by developing higher number of branches and the average leaf area (Mamatha et al. 2014; Pan et al. 2019; Fathurrahman 2023). Increased photosynthesis and reduced stomatal aperture are mainly induced by an increase in Rubisco activity and depolarization of the guard cell membrane potential, possibly leading to reduced transpiration and significantly increasing WUE (Wei et al. 2018; Da Silva Fortirer et al. 2017). At the same time, findings have been reported that there are different changes in the C, N and P stoichiometry of woody and herbaceous plants when exposed to high CO_2 concentrations, (Du et al. 2019). Furthermore, it has been reported recently that although there are known advantages of providing CO_2 in greenhouses, it could also have negative effects on nutrient absorption, particularly causing a decrease in the concentration of nitrogen in tissues (Gojon et al. 2023).

Carbon and nitrogen are the most abundant elements in cells, which intensifies the need for coordination mechanisms to avoid metabolic inefficiencies (Li et al. 2022). On the other hand, nitrogen assimilation depends on the availability of a carbon and, consequently, limitation or oversupply of one element strongly affects the metabolism of the other (Zhang et al. 2018; Baslam et al. 2020). Architectural features such as plant height, branches and panicles were reported to be affected not only by N, but also by the distribution of N in the different organs (Luo, Zhang, and Xu 2020). Moreover, it has been observed that blueberry fruit quality was related to a high carbon/nitrogen ratio (Yang et al. 2023). Therefore, dynamic variations in carbon and nitrogen metabolism in plants directly or indirectly affect the formation and transformation of photosynthates (Wu et al. 2022).

Blueberry (*Vaccinium sp. L.*), an economically important member of the *Ericaceae* family and widely distributed geographically, has become an important fruit crop worldwide. Spain represent first place in the ranking of blueberry producers in the European Union (Junta de Andalucia 2021). For optimal development, this crop must have a low pH (4.5 to 5.5) (Smrke et al. 2021). Compared to other non-ericaceous crops, blueberry plants have low mineral nutrient concentrations and, therefore, tend to have lower nutrient requirements than other fruit crops (Doyle, Nambeesan, and Malladi 2021). Due to these nutritional requirements, producers are searching for novel methods to grow plants in regions with suboptimal soil conditions, an alternative being cultivation in containers with soilless substrate and highly controlled fertilization and irrigation systems (Kingston et al. 2017).

Given the specific pH and organic matter requirements of blueberry, and the fact that agricultural soils rarely meet these criteria, growers frequently amend fields with sulfur, organic matter, or other inputs. Despite these efforts, the narrow soil preferences of blueberry limit its suitable cultivation areas. Recently, container-based production has gained popularity, as the use of soilless substrates allows cultivation in a broader range of environments. These substrates enable precise control of nutrient levels in the rhizosphere and allow cultivation on land with issues such as soil-borne pests, salinity, infertility, or chemical residues. Container production also provided flexibility, allowing growers to move plants and adjust spacing as they grow (Fang et al. 2020). Currently, blueberry plants are grown in containers using substrates supplemented with peat and synthetic minerals (such as vermiculite and expanded clay) to achieve the desired physical and chemical properties. However, preparing optimal substrate mixtures remains challenging, as these materials can exhibit characteristics that could affect plan physiology (Zárate et al. 2017).

In soilless culture, blueberries have high productivity from the first year of cultivation, and one of the main reasons for achieving this growth pattern is that soilless substrates allow the roots area to be improved by controlling the water and nutrient content (Heller and Nunez 2022). Thus, innovative horticultural practices with controlled environmental conditions such as light, humidity, temperature and CO_2 concentrations have allowed profitable crops in Spain, Morocco, Mexico, Chile, China, Peru and Argentina, where crops from temperate zones were not common a few decades ago (Bañados 2009; Fang et al. 2022; Lobos and Hancock 2015).

Although nurseries have been using soilless substrates for blueberry production for many years, the concept of commercial fruit production in containers is relatively new. Substrate mixes used in nurseries often include peat, coir, bark, and/or perlite, but it has not yet been established whether these components are equally suitable for long-term blueberry fruit production. (Fulcher et al. 2015).

Therefore, the aim of this work was to investigate CO_2 supplementation on blueberry growth and production under greenhouse-controlled conditions with different substrates. As the choice of peat/coconut fiber in substrates for growing blueberry has pointed to influence various physiological responses affecting yield and quality (Ortiz-Delvasto et al. 2024). In this study, experiments were conducted using tree different soilless substrates, one of which varied in its peat, coconut fiber and perlite composition. For that, the growth, fruit yield, gas exchange, mineral nutrition, water use efficiency (WUE) and nutrient use efficiency (NUE) was determined and related to mineral nutrients composition and to N assimilation.

Material and methods

Plant material and growth conditions

The experiments were carried out with plants of Blueberry (*V. corymbosum*, L. cv. Legacy). Blueberry plants were supplied by a commercial nursery (Viveros el Cierrón, Asturias, Spain) as plants of approximately 60 cm in height after growing in commercial greenhouse conditions.

The experimental growth stage was carried out during the months of June and July, in an automated greenhouse located in the CEBAS-CSIC experimental field in Santomera (Murcia, Spain), under regulated conditions of temperature by a cooling system that maintained temperatures of 25 °C and 20 °C (day/night). The humidity was stable ranging from 60-70%. The controlled conditions experimental phase and the elevated CO_2 experimental phase was maintained under these same conditions.

Plants were grown into 30-L pots with 3 different experimental substrates (provided by Projar, Valencia, Spain) composed of: (S1) 70% coconut fiber and 30% peat, (S2) 100% coconut fiber, (S3) 90% coconut fiber and 10% perlite. The experimental design was completely randomized with 3 cultivation lines (one line per substrate), with 30 plants, randomly distributed in 10 plants per substrate. The substrates were irrigated through continuous dripping at regular 7-min intervals, 4 times a day, with one dripper per container emitting water at of 3 L h^{-1}. The irrigation solution containing KNO_3 (6 mM), $Ca(NO_3)_2$ (4 mM), KH_2PO_4 (1 mM), and $MgSO_4$ (1 mM), H_3BO_3 (25 µM), $MnSO_4$ (2 µM), $ZnSO_4$ (2 µM), $CuSO_4$ (0.5 µM), $(NH_4)_6Mo7O24$ (0.5 µM) and Fe-EDDHA (20 µM) (Hoagland and Arnon 1938).

The plants grew under these conditions during 16 wk, until the plants reached the stage of production. After that period, the experimental design consisted in two different periods of one month each. The first period called Control conditions (ambient CO_2), where the plants grown in the different substrates (S1, S2 and S3) were with ambient CO_2 (evaluated during the first 8 wk), and the second period called Elevated CO_2 (evaluated during the last 4 wk) where the concentration of CO_2 was maintained to 1000 ppm. CO_2 was emitted through ventilation filters and gradually reaching a concentration of 1000 ppm of CO_2. The gas emission period was for 12 h each day, throughout the daylight hours (from 8:00 to 20:00). Two days before the end of both the

control conditions period and the period under elevated CO_2 conditions, 5 plants from each substrate were harvested and samples were collected for subsequent analysis.

Relative growth rate (RGR) and fruit production

Relative growth rate was determined in leaves of control conditions and high CO_2 content treatments, during 24 days with an interval of 8 days between each measurement. Leaves were selected (3 per plant in different branches) in 5 plants per substrate. This procedure was carried out *in situ* by drawing the outline of the leaf on a sheet of paper and later using the ImageJ program to calculate the area, to afterwards obtain the relative growth rate with the following equation (Primo-Millo and Agustí 2020):

$$RGR = \frac{(\mathrm{LnA2} - \mathrm{LnA1})}{(\mathrm{t1} - \mathrm{t2})}$$

Where A1 is the initial leaf area and A2 is the leaf area determined at time 2. t1 and t2 are the dates of data collection (intervals of 8 days).

Fruit production was determined during each month of control conditions (ambient CO_2) and elevated CO_2 conditions. All fruits from each plant was harvested at commercial maturation point and biomass were determined per substrate. The results are presented as the average g or number per plant per month.

Leaf gas exchange

Gas exchange parameters such as net photosynthesis rate (A_n), stomatal conductance (g_s) and internal CO_2 concentration (C_i) were measured in fully developed leaves using a TPS-2 Portable Photosynthesis System gas exchange meter (PP Systems, Inc., Amesbury, MA, USA) on a total of 4 leaves per plant from 3 plants for each substrate in each growth period (control conditions and elevated CO_2). Measurements were taken one hour after the start of the photoperiod. All observations were recorder at a PPFD (photosynthetic photon flux density) of 1500 μmol m^{-2} s^{-1} and cuvette temperature of 25 °C with 2.0 cm^2 of leaf area exposed for gas exchange. All gas exchange measurements were taken between 09:00 and 12:00 (local time).

Intrinsic water use efficiency (iWUE) and nutrient use efficiency (NUE)

Intrinsic water use efficiency measures differences related to the leaves ability to regulate photosynthesis and stomatal conductance, and which are independent of atmospheric conditions at the time of measurement. The intrinsic efficiency of water use was calculated using the formula A_n/g_s (with the units µmol CO_2 $mmol^{-1}H_2O$) (Fischer and Turner 1978), where (A_n) is the net photosynthesis of the leaf and (g_s) the stomatal conductance.

Nutrient use efficiency was determined from crop yield per unit of nutrient applied and was calculated using the following formula (McDonald et al. 2013).

$$Nutrient\ use\ efficiency = \frac{Yield(Kg^{-1}Kg^{-1})}{Quantity\ of\ fertilizer\ applied(Kg^{-1}Kg^{-1})}$$

Analysis of mineral elements

Minerals contents (macronutrients and micronutrients) were determined according the ISO 11.885 (1996) by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) using a

Thermo ICAP 6500 Duo equipment (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Lyophilized samples of leaf and fruit from 3 selected plants of each cultivation were ground into a fine powder using a grinder (Taurus Aromatic, Lleida, Spain). For each ground sample, 200 mg were added in a microwave furnace equipment to a 25 mL tube with a mixture of 4 mL of HNO_3 (68% purity) and 1 mL H_2O_2 (33% purity) for their subsequent digestion. 300 mL high-purity de-ionized water, 30 mL H_2O_2 (33% purity) and 2 mL H_2SO_4 (98% purity) were also added in the Teflon reactor. The microwave heating digestion program consisted of 3 steps: starting at 20 °C and 40 bar; increasing 10 bar/minute for 30 min up to 220 °C; and keeping 220 °C for 20 min. After cooling, the mineralized sample were transferred to double gauge tubes of 10 mL (micro minerals) and 25 mL (macro minerals), and the volume made up with high-purity de-ionized water. A multimineral standard solution containing 31 minerals supplied by SCP Science (Quebec, Canada) was used to prepare calibration standards in high-purity de-ionized water. For ICP-OES analyses, two control samples containing high-purity de-ionized water and a multimineral standard were used. Each mineral determination was performed at specific wavelengths ranging from 167.1 to 670.8 nm. The concentration of macro and micro minerals were calculated according the formula 'mg kg^{-1} or g kg^{-1} = (C x D)/W'; where C was mineral concentration, D was the dilution factor and W was sample weight.

Determination of total carbon and nitrogen

The total carbon and nitrogen content were determined by the DUMAS method, using the elemental analyzer model TRUSPEC CN628 (LECO Corporation, MI, USA) (Matejovic 1993). Lyophilized samples of leaf and fruit from 3 selected plants of each cultivation were ground into a fine powder using a grinder (Taurus Aromatic, Lleida, Spain). For each ground sample, 0.1 g of the solid sample was placed in a tin capsule, which was then closed and introduced into the autosampler of the equipment. The results expressed as percentage of weight (g $100\,g^{-1}$).

Determination of nitrite and nitrate

The determination of nitrite and nitrate was carried out in accordance with ISO 10304-1 (2007) by ion chromatography (Michalski and Kurzyca 2014), using a Metrohm 850 Ion Chromatograph (Metrohm AG, Switzerland). Samples of leaf, and fruit from 3 selected plants of each cultivation substrate and CO_2 conditions were frozen in liquid nitrogen and lyophilized. After that they were ground into a fine powder using a grinder (Taurus Aromatic, Lleida, Spain). Of each ground sample, 0.2 g was added to 40 mL of milliQ water. The sample was shaken on a mechanical shaker for 30 min and then centrifuged at 3000 rpm for 10 min.

The sample was filtered through a 0.45 micron nylon filter. Measurement was then performed in the chromatograph. A multimineral standard solution (commercial solution of different anions) supplied by SCP Science (Quebec, Canada) was used to prepare calibration standards in highly purified deionized water. The anion concentration is expressed in mg/L.

Statistical analysis

Data analyses were performed using the SPSS 25.0.0.1 software package (IBM Corp., Armonk, NY, USA). All the parameters were analyzed using one-way ANOVA, followed by post hoc Duncan's New Multiple Range Test.

Results

Relative growth rate (RGR) and fruit production

The RGR of blueberry plants in elevated CO_2 conditions were significantly higher than those of Control conditions plants (Figure 1(a)). However, no differences were observed between the plants grown in the different substrates.

Blueberry plants under control conditions (ambient CO_2) or under elevated CO_2, presented significant changes in fruit production when grown in the different substrates. In control conditions (ambient CO_2), the plants grown in S1 have higher production, compared to the plants grown in S2 and S3, which did not present significant differences. However, under elevated CO_2 conditions, all plants experienced a significant increase in production compared to control conditions plants (Figure 1(b)). In the case of elevated CO_2 plants grown in S3 had higher production in relation to the plants grown in S1 or S2.

Gas exchange

Figure 2 shows the results of the gas exchange parameters. The photosynthetic rate (A_n, Figure 2(a)) showed no significant changes in the plants grown in the different substrates in control conditions (ambient CO_2). However, under elevated CO_2, all values were significantly higher than in control conditions plants independently of the substrates. Furthermore, on elevated CO_2 substrates S2 and S3 showed a significantly higher photosynthetic rate relative to plants grown on S1.

The internal CO_2 concentration (C_i, Figure 2(b)) did not show significant differences among substrates in control conditions. However, this parameter increased significantly in all plants grown in different substrates subjected to elevated CO_2, compared to control conditions plants. The plants grown in S2 substrate presented the highest Ci in elevated CO_2 conditions in relation to the plants grown in S1 and S3, with the plants grown in S3 providing the lowest C_i values.

Stomatal conductance (g_s, Figure 2(c)) increased significantly in plants grown on all substrates under elevated CO_2 conditions relative to control conditions plants. The plants grown in control conditions did not show significant differences within the different substrates. Under elevated CO_2 conditions, plants grown in S2 substrate presented a significant increase in relation to plants

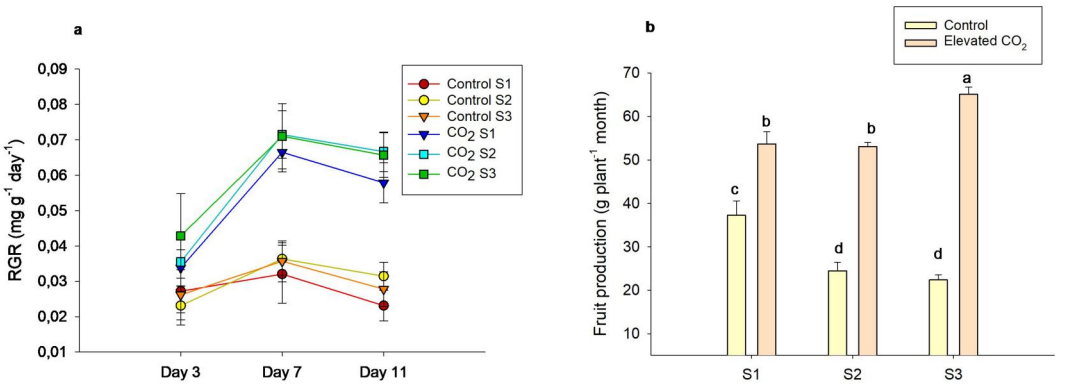


Figure 1. (a). Relative growth rate of leaves of the blueberry plant with substrates S1, S2 and S3 under control conditions *(ambient CO_2)* and under conditions of elevated CO_2. measured for 11 days with an interval of 4 days between each measurement. Points indicate the mean ± SE of 3 samples with 3 measurements each. (b). Fruit production per month of the blueberry plant with substrates S1, S2 and S3 during 30 days under control conditions and under conditions of elevated CO_2. Each value represents the average production of 5 plants ± SE. Means followed by different letters were significantly different according to duncan's test.

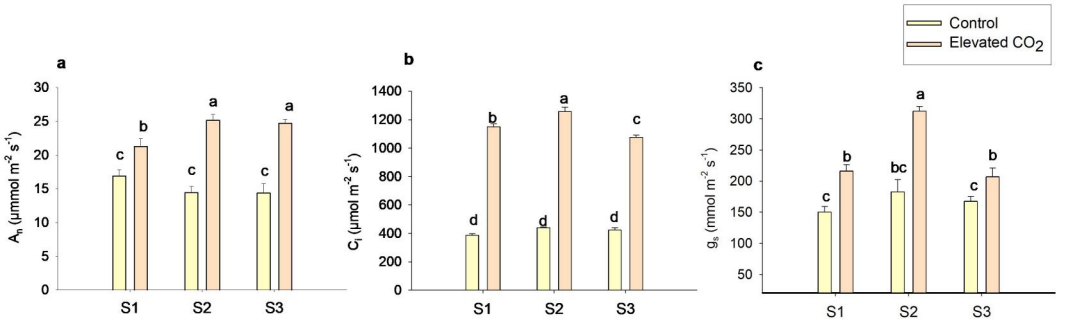


Figure 2. Gas exchange parameters of blueberry plant with substrates S1, S2 and S3 under control conditions and under conditions of elevated CO_2. (a) Photosynthesis rate (A_n, μmol m^{-2} s^{-1}), (b) internal CO_2 concentration (C_i, μmol m^{-2} s^{-1}), (c) stomatal conductance (g_s, mmol $m^{-2}s^{-1}$). Values are means ± SE ($n = 3$). For each treatment, different letters show significant differences according to duncan's test.

grown in S1 and S3 substrate. No significant differences were found between plants grown in S1 and S3.

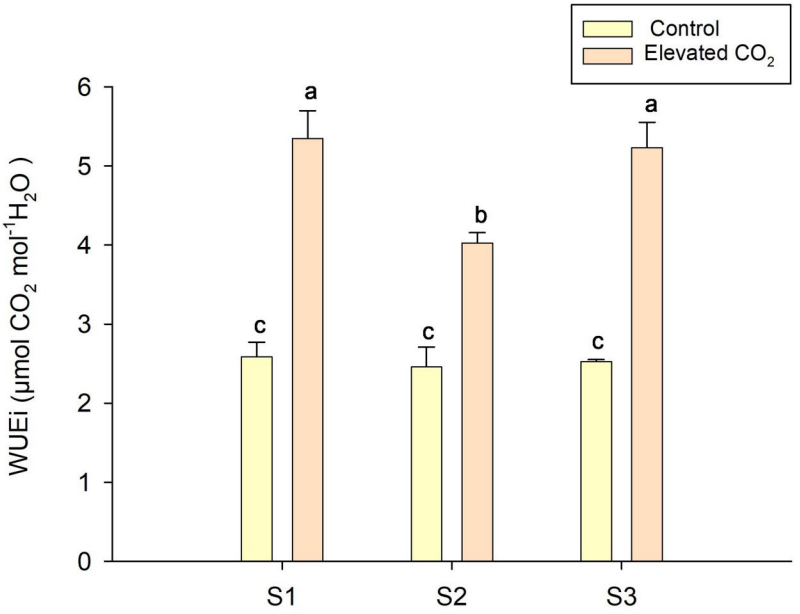
Intrinsic water use efficiency (WUEi) and nutrient use efficiency (NUE)

The water use efficiency did not present significant differences in the plants grown in different substrates under control conditions (ambient CO_2). However, under elevated levels of CO_2, they showed significant increases in relation to the control conditions plants. Plants grown on substrates S1 or S3 under elevated CO_2 conditions showed a significant increase in WUEi compared to S2, and these plants had the lowest WUEi.

In relation to the nutrient use efficiency, plants showed a significant increase when they were subjected to elevated CO_2 conditions compared to control conditions independently of the type of substrate. Under control conditions, plants grown in S3 substrate presented a greater NUE values, in all individual nutrients, in relation to plants grown in S1 or S2. Plants grown in S2 presented the lowest values. Also, significant differences observed between plants grown in S1, S2 and S3, under elevated CO_2 conditions. The S3 substrate on elevated CO_2 conditions presented a greater NUE, in relation to the plants grown in S1 or S2, with the plants grown in S2 substrate being the ones that presented the lowest NUE (Figure 3).

Concentration of mineral elements

The blueberry plants subjected to high concentration of CO_2 levels showed a generalized decrease of the main macronutrients and micronutrients, both in leaves and fruits of plants grown in S1, S2 or S3, in relation to plants grown under control conditions (plants grown in S1, S2 or S3 under ambient CO_2 conditions) (Table 1). Regarding the macronutrients of the plants subjected to elevated CO_2, Ca is one of the few elements that showed an increase in concentration in leaves of plants grown in S1 and S2 substrate. In relation to the fruit, the concentration of Ca was lower in plants grown under elevated CO_2 conditions (independently of the substrates) compared with those grown in control conditions (with ambient CO_2). The concentration of K presented a higher concentration in the leaves of the plants grown in all substrate under control conditions (ambient CO_2) compared to high CO_2. The concentration of this nutrient showed no changes in fruits. The concentration of Mg in the leaves presents a significant increase in plants grown with S1 substrate when subjected to elevated CO_2 conditions. In relation to the fruit, this nutrient did not present significant differences either in control and elevated CO_2 in the different substrates. The concentration of P presented in leaf and fruit, in all S1, S2 and S3 substrates, did not show



		Nutrient use efficiency (NUE)					
	Nutrients	S1		S2		S3	
		Control	Elevated CO_2	Control	Elevated CO_2	Control	Elevated CO_2
kg kg^{-1}	KNO_3	1.190 ± 0.019e	1.794 ± 0.010b	0.888 ± 0.005f	1.382 ± 0.006d	1.725 ± 0.015c	2.520 ± 0.029a
	$Ca(NO_3)_2$	0.772 ± 0.009e	1.148 ± 0.014b	0.574 ± 0.013f	0.891 ± 0.011d	1.102 ± 0.004c	1.632 ± 0.010a
	KH_2PO_4	4.591 ± 0.013e	6.922 ± 0.011b	3.426 ± 0.014f	5.326 ± 0.015d	6.656 ± 0.014c	9.792 ± 0.017a
	$MgSO_4$	2.465 ± 0.012d	3.712 ± 0.008b	1.841 ± 0.022d	2.866 ± 0.014c	4.2267 ± 0.621b	5.276 ± 0.034a
g kg^{-1}	Fe-EDTA	32.135 ± 0.004e	48.543 ± 0.374b	23.967 ± 0.007f	37.023 ± 0.243d	46.810 ± 0.261c	68.366 ± 0.135a
	Micronutrients	32.054 ± 0.072d	47.443 ± 0.960b	23.967 ± 0.058e	36.991 ± 0.066c	46.810 ± 0.310b	68.113 ± 0.031a

Figure 3. Intrinsic water use efficiency (WUEi) (µmol CO_2 mol^{-1} H_2O) and nutrient use efficiency (NUE) macronutrients (kg kg^{-1}) and micronutrients (g kg^{-1}) of blueberry plant with substrates S1, S2 and S3 under control conditions and under conditions of elevated CO_2. Values are means ± SE ($n = 3$). For each treatment, different letters show significant differences according to Duncan's test.

significant differences under both CO_2 conditions. The concentration of S present in the leaves of the plants showed lower values under high CO_2 than under ambient CO_2. In relation to the concentration in the fruit, there were no significant differences in any of the substrates and in any of the CO_2 conditions (ambient CO_2) or elevated CO_2 conditions.

Regarding the micronutrients in plants subjected to elevated CO_2 contents, a decrease in the concentration of B observed in both the leaves and fruits of plants grown in all substrates. Fe presented higher values in the foliar and fruit concentration of plants grown control conditions (ambient CO_2) than in high CO_2. Manganese increased the concentration in leaves of plants grown in S2 and S3 substrates under elevated CO_2 conditions. However, in fruits, the concentration decreased in plants grown in all substrates, when subjected to elevated CO_2 levels. Finally, Zn presented higher values in the leaves of plants grown in S1 substrate under control conditions (ambient CO_2). In relation to the fruit, this nutrient did not present significant differences under both CO_2 conditions.

Table 1. Concentration of mineral elements. Macronutrients (g kg^{-1}DW) and micronutrients (mg kg^{-1}DW) measured in leaf and fruit of blueberry plant with substrates S1, S2 and S3 in control conditions and elevated CO_2 conditions.

		S1				S2				S3			
		Leaf		Fruit		Leaf		Fruit		Leaf		Fruit	
	Element	Control	CO_2	Control	CO_2	Control	CO_2	Control	CO_2	Control	CO_2	Control	CO_2
Macronutrients	Ca	1.54 ± 0.65b	1.94 ± 0.27a	0.42 ± 0.02c	0.26 ± 0.02c	1.57 ± 0.28b	2.31 ± 0.28a	0.41 ± 0.03c	0.28 ± 0.04c	2.02 ± 0.86a	2.06 ± 0.04a	0.38 ± 0.03c	0.20 ± 0.01c
(g kg^{-1} DW)	K	12.96 ± 1.16a	7.02 ± 0.02 cd	7.22 ± 0.13 cd	6.29 ± 0.22 cd	12.28 ± 0.16ab	6.46 ± 0.46 cd	7.43 ± 0.16 cd	6.33 ± 0.11 cd	11.27 ± 0.95b	6.51 ± 0.12 cd	7.15 ± 0.17 cd	5.90 ± 0.01d
	Mg	0.87 ± 0.07b	1.05 ± 0.03a	0.29 ± 0.02c	0.27 ± 0.02c	0.91 ± 0.04b	0.89 ± 0.07b	0.28 ± 0.02c	0.24 ± 0.01c	0.94 ± 0.06ab	0.90 ± 0.03b	0.29 ± 0.01c	0.24 ± 0.01c
	P	2.10 ± 0.57a	2.13 ± 0.25a	0.88 ± 0.02a	0.75 ± 0.04a	1.25 ± 0.03a	1.66 ± 0.09a	0.94 ± 0.04a	0.83 ± 0.05a	1.76 ± 0.21a	1.77 ± 0.06a	1.04 ± 0.04a	0.79 ± 0.04a
	S	1.64 ± 0.06a	1.30 ± 0.17c	0.61 ± 0.01d	0.54 ± 0.04d	1.62 ± 0.10a	1.24 ± 0.06c	0.63 ± 0.01d	0.51 ± 0.02d	1.55 ± 0.09b	1.36 ± 0.08bc	0.64 ± 0.02d	0.47 ± 0.02d
Micronutrients	B	40.39 ± 1.86a	19.51 ± 0.78b	6.87 ± 0.06d	6.46 ± 0.04e	38.05 ± 1.06a	18.51 ± 0.25bc	8.04 ± 0.20de	6.12 ± 0.07e	44.62 ± 12.46a	17.67 ± 0.43bc	8.11 ± 0.39d	5.85 ± 0.09e
(mg kg^{-1} DW)	Fe	100.57 ± 56.10a	34.24 ± 2.14b	27.50 ± 0.89b	8.33 ± 0.19c	40.49 ± 5.90b	42.98 ± 1.50b	30.33 ± 0.36b	12.04 ± 0.24c	47.08 ± 11.68c	50.17 ± 0.50b	22.85 ± 1.45b	7.85 ± 0.10c
	Mn	39.30 ± 5.75e	43.88 ± 2.81de	7.46 ± 0.33f	5.95 ± 0.04 g	59.02 ± 13.61c	90.68 ± 1.26a	13.00 ± 1.53f	9.25 ± 0.82f	56.69 ± 1.22 cd	75.71 ± 1.57b	13.35 ± 1.49f	9.19 ± 0.11f
	Zn	30.09 ± 6.66a	21.91 ± 1.45b	5.03 ± 0.19c	5.50 ± 0.60c	21.05 ± 1.85b	16.05 ± 2.29b	5.38 ± 0.34c	5.56 ± 0.31c	19.77 ± 0.80b	22.94 ± 3.16b	5.78 ± 0.33c	6.54 ± 0.27c

Results are expressed as the mean of three biological replicates ± standard error. Different letters show significant differences according to Duncan's test.

Determination of total carbon and nitrogen

The N concentration (Figure 4) in the leaves of plants grown in all S1, S2 and S3 substrates did not show significant variations under elevated CO_2 conditions compared to the control conditions (ambient CO_2). In fruits, the N concentration showed a significant increase in the fruits of plants grown in S2, when they were exposed to elevated CO_2. The fruits of the plants grown in S1 or S3 did not show significant differences when subjected to elevated CO_2 when compared with ambient CO_2 conditions.

The leaf C concentration showed a significant increase in the leaves of the plants in all S1, S2 and S3 under elevated CO_2 in relation to the plants grown in ambient CO_2 conditions. In relation to C concentration in the fruits, a significant increase was observed in the plants grown in S1 or S2, when they were subjected to elevated CO_2 concentrations, compared to the control conditions. Plants grown in S3 showed no significant differences between the ambient CO_2 conditions and those subjected to elevated CO_2.

Determination of nitrite and nitrate

The nitrite (NO_2^-) concentration (Table 2) in leaves and fruits increased significantly to a similar value in the plants grown in S1, S2 and S3 when subjected to elevated CO_2 conditions as compared to control conditions. In control conditions leaves and fruits, the values were very low

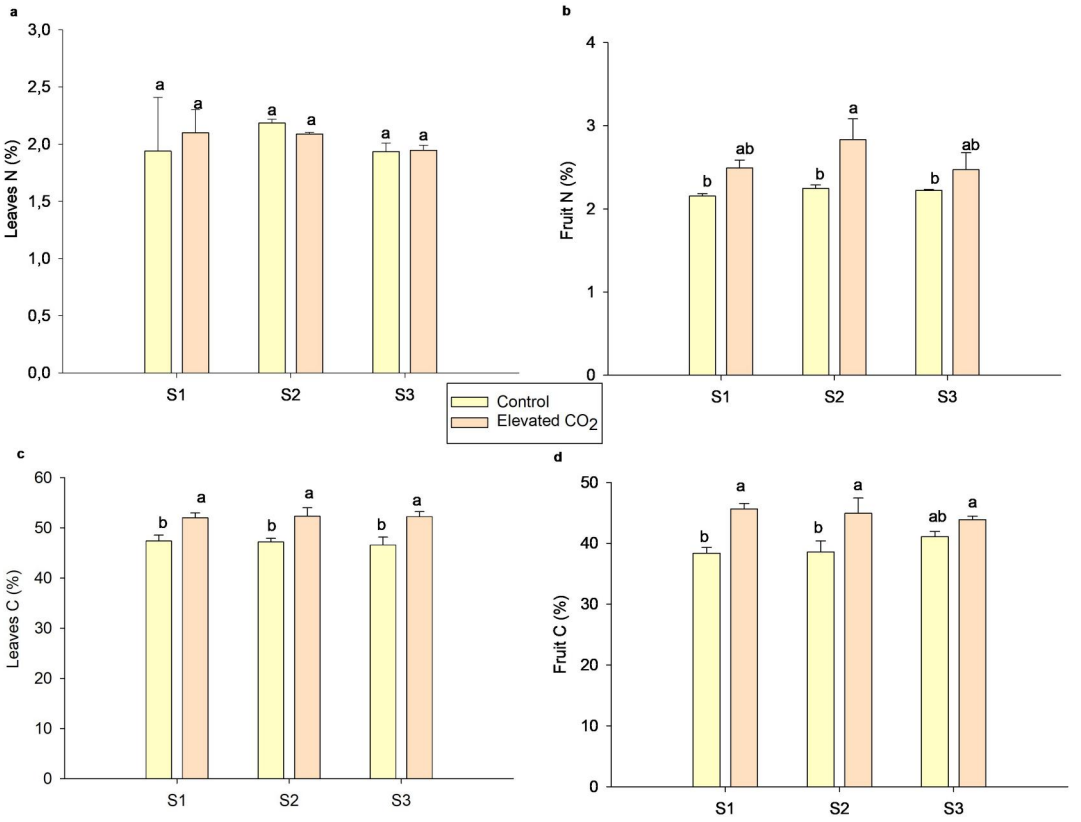


Figure 4. Concentration of total carbon and nitrogen. (a) percentage of N in leaves, (b) percentage of N in fruit, (c) percentage of C in leaves, (d) percentage of C in fruit, measured in plants grown with substrates S1, S2 and S3 in control conditions and elevated CO_2 conditions. Results are expressed as the mean ± SE ($n = 3$). Columns with different letters differ significantly according to duncan's test.

showing <0.01 mg 100 g^{-1}D.W. in all leaves of the different substrates, and in fruits of S1 and S3 substrates. However, the concentration was detectable in fruits of S2 in control conditions (0.22 mg 100 g^{-1}D.W).

The results of nitrate concentration (NO_3^-) revealed a different pattern between leaf and fruit. In the case of leaves, a significant decrease was observed in plants grown in both S1, S2 and S3, when subjected to elevated CO_2 concentrations compared to the control conditions. On the contrary, in the fruits of plants grown in all S1, S2 and S3 substrate, a significant increase was observed when they were subjected to elevated CO_2 conditions in relation to the control conditions.

Discussion

It is known that high CO_2 increase the growth and development of herbaceous plants (Roy, Kapoor, and Mathur 2024). However, the studies of the response of woody plants is very limited. In this way, the studies reports that, in general, elevated CO_2 produced higher photosynthetic rate, generating increases in growth and productivity, but the responses will depend on water uptake and mineral nutrition (Mndela et al. 2022). In this sense, our blueberry plants presented a positive effect on growth by elevated CO_2 in all substrates, increasing the speed of growth and production. These results coincide with studies carried out on mulberry plants (*Morus* sp) where they found persistent increases in the photosynthetic rate when subjecting them to high CO_2 conditions (Sekhar et al. 2014). Photosynthesis has been reported to be significantly improved due to the carboxylation role of Rubisco being favored to the detriment of its oxygenating activity, increasing photosynthetic efficiency (Lobo et al. 2022). This enhancing results have been previously reported in various studies on woody plants as *Camellia sinensis* L. grown in chambers (Ahammed et al. 2020), in *Cornus drummondii* C.A. Mey., *Rhus glabra* L., *Gleditsia triacanthos* L., *Juniperus osteosperma* Torr. grown in a greenhouse (O'Connor et al. 2022) and bitter orange trees planted in open chambers with plastic for 17 years, with elevated CO_2 (Kimball et al. 2007). The level of CO_2 is also a question of debate since projections of atmospheric CO_2 concentration will range between about 450 and 600 ppm by the year 2050 since we are strongly dependent on future scenarios of anthropogenic emissions (Woodward 2002). However, the fact that this high levels were only applied for one month should be taken into account.

Our blueberry plants showed an increase in net photosynthesis rate (A_n), stomatal conductance (g_s) and internal CO_2 concentration (C_i) under elevated CO_2 conditions, in all S1, S2 and S3 substrates, relative to control conditions plants. However, the plants grown in S2 or S3 subjected to elevated CO_2 conditions presented the highest growth and highest values of the photosynthetic rate, in relation to S1. This result can be attributed to the composition of the substrate and its physical characteristics reported previously (Ortiz-Delvasto et al. 2024), since S2 and S3 were composed mainly of coconut fiber which has the capacity to retain more water and provide greater aeration compared to other substrates (Gómez-Bellot et al. 2020). On the other hand, as Ci did not show changes in control conditions (ambient CO_2), but an increase in this parameter was observed similarly in plants grown in either S1 or S3 under elevated CO_2.

Various studies have shown that the behavior of Gs under conditions of elevated CO_2 is contradictory and could be specific to each specie (Purcell et al. 2018). Accordingly, measurements on woody plants, demonstrated that Gs could increase in response to elevated CO_2 levels under specific climatic conditions (high temperature and low humidity) but depending on water availability (Purcell et al. 2018). In blueberry, previous works reported the effect of source-sink balance on foliar traits and found a positive correlation between stomatal conductance and photosynthesis (Jorquera-Fontena et al. 2016), demonstrating that blueberry plants could have the capacity to respond to changes in the demand by photoassimilates by altering stomatal, photochemical, and biochemical parameters (Petridis et al. 2020). In this sense, we observed that

Table 2. Concentration of NO_2^- and NO_3^- measured in leaf and fruit of blueberry plant with substrates S1, S2 and S3 in control conditions and elevated CO_2 conditions.

		S1				S2				S3			
		Leaf		Fruit		Leaf		Fruit		Leaf		Fruit	
	Element	Control	CO_2	Control	CO_2	Control	CO_2	Control	CO_2	Control	CO_2	Control	CO_2
(mg 100 g^{-1}	NO_2^-	<0.01	0.50 ± 0.01d	<0.01	0.61 ±0.02 bc	<0.01	0.64 ± 0.01ab	0.22 ± 0.02 f	0.59 ± 0.02c	<0.01	0.45 ± 0.01e	<0.01	0.65 ± 0.00 a
DW)	NO_3^-	1.92 ± 0.00 a	0.64 ± 0.02 f	0.34 ± 0.02 g	1.01 ± 0.01c	1.43 ± 0.01b	0.78 ± 0.01d	0.76 ± 0.01de	1.03 ± 0.02c	1.45 ± 0.02 b	1.04 ± 0.02c	0.73 ± 0.01e	1.01 ± 0.01c

Results are expressed as the mean of three biological replicates ± SE. Values within a column followed by different letters are significantly different according to Duncan's tests.

blueberry plants in S2 grown under elevated CO_2 conditions somehow had the ability to increase Gs by the 100% of coconut fiber in the substrate. It has been reported that the increase of AW in soils could improve stomatal conductance and net assimilation rate, resulting in increased photosynthetic capacity in species such as black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) (Liu et al. 2013), but the fact that S1 and S3 showed similar g_s values indicate that, again, other parameter is influencing.

Substrates S1 and S3 presented higher WUE and NUE in elevated CO_2 conditions, indicating that these plants have the ability to balance water use and carbon assimilation to a higher extent than S2. The higher values of water use efficiency (WUE) and nutrient use efficiency (NUE), in each individual nutrient, in S1 and S3 were possibly occurring due to the composition of peat (S1) and perlite (S3) that was promoting higher water and nutrient availability (Ortiz-Delvasto et al. 2024), being the nitrogen compounds those that provide higher NUE increases (Domec, Duncan, and McCulloh 2017; McCarthy et al. 2010).

Elevated CO_2 caused a significant failed to increase in the concentration of macronutrients, K and S, and micronutrients, B and Fe, in blueberry leaves and fruits grown in all S1, S2 and S3 substrates, in relation to plants grown under control conditions (ambient CO_2). As it has been reported that the increase in yield caused by elevated CO_2 can reduce the mineral quality in the edible parts of crops (Dong et al. 2018) in our case, it occurred at a very low extent in fruits for K, S, and B. However, Fe and Zn was observed to be limited in leaves but Fe greatly decrease fruits with all substrates. The suppression of Fe and Zn has been reported in rice (*Oryza sativa* L.) under elevated CO_2 (Chumley and Hewlings 2020) and also in cotton (*Gossypium herbaceum* L.) (Prior et al. 1998), but they could not asses the mechanism leading to such reduction. Although, several hypotheses have been proposed, any of them could fit with our results. Some reports indicated that the low nutrient concentrations is a result of nutrient dilution, which occurs because the increase in carbohydrates synthesis is greater than the increase in nutrient absorption under elevated CO_2 conditions (Guo et al. 2015). Accordingly, also Ca was suppressed in the fruits of blueberry plants subjected to high CO_2 conditions could be think in opposite to the study carried out by Fangmeier et al. (1999), where they found an increase in Ca and Fe in the grain of wheat under elevated CO_2 conditions. However, the fact that they blueberry are fruits and wheat are seed could reduce the confronting results.

Our study demonstrated that elevated CO_2 did not affect the concentration of total N in the leaves or fruit, but the concentration of total N in fruit increased in plants grown in S2 under elevated CO_2 conditions. This action was probably because S2 is composed only of coconut fiber, which has a high water retention capacity, good aeration capacity, which allows greater water availability and therefore greater nutrient retention (Ortiz-Delvasto et al. 2024). Accordingly, He et al. (2014) found that elevated CO_2 in soybeans increased the entry of labile C into the soil, so there are more microbial carbon sources, which increases the abundance of genes in the N cycle. Poorter et al. (1997) observed that the decrease in total nitrogen in leaves under elevated CO_2 conditions was lower when plants were grown in hydroponics than in pots, which suggests it is related to the improvement of nitrogen nutrition in hydroponic cultivation.

Under control conditions (ambient CO_2), plants grown in S1 presented a higher concentration of NO_3^- in the plant leaf, in relation to plants grown in S2 or S3. This result can be attributed to the high cation exchange capacity of peat-based substrates, which primarily affects the retention of cations but has little impact on nitrate, making it more available and influencing overall plant dynamics. This likely explains the increased nitrate concentration in S1 plants (Bar-Tal et al. 2019). However, the lower nitrate concentrations observed under high CO_2 conditions indicate more efficient nitrogen metabolism.

Research suggests that the N uptake preference of blueberry plants is for ammonium rather than nitrate, probably due to an evolutionary mechanism resulting from the adaptation of

blueberries to habitats characterized by acid soils, where ammonium is the most abundant inorganic N ion available (Claussen and Lenz 1999; Poonnachit and Darnell 2004; Nunez, Olmstead, and Darnell 2015; Bryla and Strik 2015). However, it is not clear whether the improved performance of blueberry plants at high NH_4^+ concentrations was due to increased N uptake or to increased uptake of microelements such as iron, manganese or zinc, which are more accessible at low rhizosphere pH (Tamir et al. 2021). In our trial, we used NO_3^- as the main source of N with high rates of absorption possibly due to the pH adjustment of the nutrient solution.

Differences were found in the concentration of NO_2^-, NO_3^- ions when the plants were subjected to elevated CO_2 conditions in all the substrates. A generalized limitation in the concentration of leaf NO_3^- was observed in plants grown in S1, S2 and S3. Various studies report a decrease in the concentration of NO_3^- in plants grown under elevated CO_2 conditions (Purvis, Peters, and Hageman 1974; Yelle, Gosselin, and Trudel 1987; Geiger et al. 1998; Stitt and Krapp 1999). On the contrary, regardless of the substrate, an increase in NO_2^- concentration was observed in both leaves and fruit under elevated CO_2 conditions. Taken together, these changes in the concentration of total N, nitrate and nitrite under conditions of elevated CO_2 can indicate that high CO_2 can cause greater nitrogen absorption, provided that the nitrogen supply is adequate, but, the assimilation of inorganic nitrogen could be modified (Stitt and Krapp 1999). To understand the decrease in nitrogen concentration, Taub and Wang (2008) found that the reduced uptake of nitrogen is likely caused by a decreased demand for nitrogen by the plant tissues and a reduced ability of the soil/root system to supply nitrogen to the rest of the plant. In our substrates, it can be observed that plants grown in S2 has low ability to absorb nitrogen and low adaptation to assimilate nitrogen since NO_2^- was found at higher concentrations than with the rest of substrates either in leaves or fruits.

Conclusion

In our study with blueberry plants, it was observed that elevated CO_2 levels (1000 ppm) produced faster growth and increased fruit production in relation to enhanced photosynthesis, internal CO_2 concentration, and stomatal conductance. Also, elevated CO_2 positively influenced overall plant nutrition by improving nutrient use efficiency (NUE) and water use efficiency (WUE). However, the nutritional status of the plants was strongly influenced by the substrate composition, which affected how efficiently nutrients were absorbed. Accordingly, the composition of the substrates played a key role in plant development. Substrates S3 (90% coconut fiber and 10% perlite) and S1 (70% coconut fiber and 30% peat) were found to be more suitable for blueberry cultivation under elevated CO_2 conditions, as they facilitate nutrient and water uptake, likely due to the inclusion of perlite and peat. Also, the nitrate concentration in leaves of blueberry of plants grown in S1 revealed a relation to peat composition and the cationic exchange capacity. Considering the results related to the suppression of K, S, B and Fe by high CO_2, further investigation is needed to understand the mechanisms which is independent of the substrate composition.

Acknowledgements

The authors thank PROJAR, S.L. for supplying the substrates.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This research was funded by Spanish Ministerio de Ciencia e Innovacion, CDTI with the 0 E-Missions Project (MIP-20201045).

ORCID

Nidia Ortiz-Delvasto http://orcid.org/0000-0002-2224-8707
Micaela Carvajal http://orcid.org/0000-0001-7321-4956

References

Ahammed, G. J., L. Xin, L. Airong, and C. Shuangchen. 2020. Physiological and defense responses of tea plants to elevated CO2: A review. *Frontiers in Plant Science* 11 (March):305. doi: 10.3389/fpls.2020.00305.

Bañados, M. P. 2009. Expanding blueberry production into non-traditional production areas: Northern Chile and Argentina, Mexico and Spain. *Acta Horticulturae* 810 (810):439–45. doi: 10.17660/ActaHortic.2009.810.57.

Bar-Tal, A., U. Saha, M. Raviv, and M. Tuller. 2019. Chapter 7 - Inorganic and synthetic organic components of soilless culture and potting mixtures. In *Soilless culture*, ed. Michael Raviv, J. Heinrich Lieth, and Asher Bar-Tal. 2nd ed., 259–301. Boston: Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-444-63696-6.00007-4.

Baslam, M., T. Mitsui, K. Sueyoshi, and T. Ohyama. 2020. Recent advances in carbon and nitrogen metabolism in C3 plants. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (1):1–39. doi: 10.3390/ijms22010318.

Bishop, K. A., A. Leakey, and E. A. Ainsworth. 2014. How seasonal temperature or water inputs affect the relative response of C3 crops to elevated [CO2]: A global analysis of open top chamber and free air CO2 enrichment studies. *Food and Energy Security* 3 (1):33–45. doi: 10.1002/fes3.44.

Bryla, D. R., and B. C. Strik. 2015. Nutrient requirements, leaf tissue standards, and new options for fertigation of northern highbush blueberry. *HortTechnology* 25 (4):464–70. doi: 10.21273/HORTTECH.25.4.464.

Claussen, W., and F. Lenz. 1999. Effect of ammonium or nitrate nutrition on net photosynthesis. *Plant and Soil* 208 (1):95–102. https://link.springer.com/content/pdf/10.1023/A%3A1004543128899.pdf. doi: 10.1023/A:1004543128899.

Curtis, P. S., and X. Wang. 1998. A meta-analysis of elevated CO2 effects on woody plant mass, form, and physiology. *Oecologia* 113 (3):299–313. doi: 10.1007/s004420050381.

Chumley, H., and S. Hewlings. 2020. The effects of elevated atmospheric carbon dioxide [CO2] on micronutrient concentration, specifically iron (Fe) and zinc (Zn) in rice; a systematic review. *Journal of Plant Nutrition* 43 (10):1571–8. doi: 10.1080/01904167.2020.1739303.

Da Silva Fortirer, J., A. Grandis, D. Pagliuso, C. De Toledo Castanho, and M. Silveira Buckeridge. 2023. Meta-analysis of the responses of tree and herb to elevated CO_2 in Brazil. *Scientific Reports* 13 (1):15832. doi: 10.1038/s41598-023-40783-5.

Da Silva, J. R., A. E. Patterson, W. P. Rodrigues, E. Campostrini, and K. L. Griffin. 2017. Photosynthetic acclimation to elevated CO2 combined with partial rootzone drying results in improved water use efficiency, drought tolerance and leaf carbon balance of grapevines (Vitis Labrusca). *Environmental and Experimental Botany* 134: 82–95. doi: 10.1016/j.envexpbot.2016.11.007.

Domec, J. C., D. S. Duncan, and K. A. McCulloh. 2017. A synthesis of the effects of atmospheric carbon dioxide enrichment on plant hydraulics: Implications for whole-plant water use efficiency and resistance to drought. *Plant, Cell & Environment* 40 (6):921–37. doi: 10.1111/pce.12843.

Dong, J., X. Qiao, G. Nazim, C. Wenying, L. Xun, and D. Zengqiang. 2018. Elevated and super-elevated CO2 differ in their interactive effects with nitrogen availability on fruit yield and quality of cucumber. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98 (12):4509–16. doi: 10.1002/jsfa.8976.

Doyle, J. W., S. U. Nambeesan, and A. Malladi. 2021. Physiology of nitrogen and calcium nutrition in blueberry (Vaccinium Sp.). *Agronomy* 11 (4):765. doi: 10.3390/agronomy11040765.

Du, C., X. Wang, M. Zhang, J. Jing, and Y. Gao. 2019. Effects of elevated CO2 on plant C-N-P stoichiometry in terrestrial ecosystems: A meta-analysis. *The Science of the Total Environment* 650 (Pt 1):697–708. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.051.

Fang, Y., G. Nunez, M. Da Silva, D. Phillips, and P. Munoz. 2020. A review for southern highbush blueberry alternative production systems. *Agronomy* 10 (10):1531. doi: 10.3390/agronomy10101531.

Fang, Y., G. Nunez, P. Fisher, and P. Munoz. 2022. Effect of container size, substrate composition, and genotype on growth and fruit quality of young southern highbush blueberry in a container-based intensive production system. *Scientia Horticulturae* 302 (March):111149. doi: 10.1016/j.scienta.2022.111149.

Fangmeier, A., L. De Temmerman, L. Mortensen, K. Kemp, J. Burke, R. Mitchell, M. Van Oijen, and H. Weigel. 1999. Effects on nutrients and on grain quality in spring wheat crops grown under elevated CO2 concentrations

and stress conditions in the european, multiple-site experiment 'ESPACE-Wheat'. *European Journal of Agronomy* 10 (3-4):215–29. doi: 10.1016/S1161-0301(99)00012-X.

Fathurrahman, F. 2023. Effects of carbon dioxide concentration on the growth and physiology of *Albizia saman* (Jacq.) merr. *Journal of Ecological Engineering* 24 (9):302–11. doi: 10.12911/22998993/169145.

Fischer, R. A., and N. C. Turner. 1978. Plant productivity in the arid and semiarid zones. *Annual Review of Plant Physiology* 29 (1):277–317. doi: 10.1146/annurev.pp.29.060178.001425.

Fulcher, A., N. Gauthier, W. Klingeman, F. Hale, and S. White. 2015. Blueberry culture and pest, disease, and abiotic disorder management during nursery production in the southeastern U.S.A Review. *Journal of Environmental Horticulture* 33 (1):33–47. doi: 10.24266/0738-2898-33.1.33.

Geiger, M. P., P. Walch-Liu, C. Engels, J. Harnecker, E. Schulze, F. Ludewig, U. Sonnewald, W. Scheible, and M. Stitt. 1998. Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants, and a large stimulation of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. *Plant, Cell & Environment* 21 (3):253–68. doi: 10.1046/j.1365-3040.1998.00277.x.

Gojon, A., O. Cassan, L. Bach, L. Lejay, and A. Martin. 2023. The decline of plant mineral nutrition under rising CO2: Physiological and molecular aspects of a bad deal. *Trends in Plant Science* 28 (2):185–98. doi: 10.1016/j.tplants.2022.09.002.

Gómez-Bellot, M., B. Lorente, M. Sánchez-Blanco, M. Ortuño, P. Nortes, and J. Alarcón. 2020. Influence of mixed substrate and arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthetic efficiency, nutrient and water status and yield in tomato plants irrigated with saline reclaimed waters. *Water (Switzerland)* 12 (2):438. doi: 10.3390/w12020438.

Guo, J., M. Zhang, X. Wang, and W. Zhang. 2015. A possible mechanism of mineral responses to elevated atmospheric CO2 in rice grains. *Journal of Integrative Agriculture* 14 (1):50–7. doi: 10.1016/S2095-3119(14)60846-7.

Han, X., Y. Sun, J. Chen, Z. Wang, H. Qi, Y. Liu, and Y. Liu. 2023. Effects of CO2 enrichment on carbon assimilation, yield and quality of oriental melon cultivated in a solar greenhouse. *Horticulturae* 9 (5):561. doi: 10.3390/horticulturae9050561.

He, Z., J. Xiong, A. Kent, Y. Deng, K. Xue, G. Wang, L. Wu, J. Van Nostrand, and J. Zhou. 2014. Distinct responses of soil microbial communities to elevated CO2 and O3 in a soybean agro-ecosystem. *The ISME Journal* 8 (3):714–26. doi: 10.1038/ismej.2013.177.

Heller, C., and G. Nunez. 2022. Preplant fertilization increases substrate microbial respiration but does not affect southern highbush blueberry establishment in a coconut coir-based substrate. *HortScience* 57 (1):17–21. doi: 10.21273/HORTSCI16220-21.

Hoagland, D. R., and D. I. Arnon. 1938. The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agricultural Experiment Station* 347:39.

Jacotot, A., C. Marchand, S. Gensous, and M. Allenbach. 2018. Effects of elevated atmospheric CO2 and increased tidal flooding on leaf gas-exchange parameters of two common mangrove species: Avicennia marina and Rhizophora stylosa. *Photosynthesis Research* 138 (2):249–60. doi: 10.1007/s11120-018-0570-4.

Jorquera-Fontena, E., M. Alberdi, M. Reyes-Díaz, and N. Franck. 2016. Rearrangement of leaf traits with changing source-sink relationship in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) leaves. *Photosynthetica* 54 (4):508–16. doi: 10.1007/s11099-016-0207-9.

Junta de Andalucia. 2021. Red Fruit, Sector Basic Data on Blueberry. Campaign Red Fruit Sector 2020–2021.

Kimball, B. 1983. Carbon dioxide and agricultural yield: An assemblage and analysis of 430 prior observations 1. *Agronomy Journal* 75 (5):779–88. doi: 10.2134/agronj1983.00021962007500050014x.

Kimball, B., S. Idso, S. Johnson, and M. Rillig. 2007. Seventeen years of carbon dioxide enrichment of sour orange trees: Final results. *Global Change Biology* 13 (10):2171–83. doi: 10.1111/j.1365-2486.2007.01430.x.

Kingston, P., C. Scagel, D. Bryla, and B. Strik. 2017. Suitability of sphagnum moss, coir, and douglas fir bark as soilless substrates for container production of highbush blueberry. *HortScience* 52 (12):1692–9. doi: 10.21273/HORTSCI12374-17.

Li, Q., Y. Ren, H. Fu, Z. Li, F. Kong, and J. Yuan. 2022. Cultivar differences in carbon and nitrogen accumulation, balance, and grain yield in maize. *Frontiers in Plant Science* 13 (September):992041. doi: 10.3389/fpls.2022.992041.

Liu, X., H. Zhang, J. Wang, X. Wu, S. Ma, Z. Xu, T. Zhou, N. Xu, X. Tang, and B. An. 2019. Increased CO2 concentrations increasing water use efficiency and improvement psii function of mulberry seedling leaves under drought stress. *Journal of Plant Interactions* 14 (1):213–23. doi: 10.1080/17429145.2019.1603405.

Liu, X., Y. Fan, J. Long, R. Wei, R. Kjelgren, C. Gong, and J. Zhao. 2013. Effects of soil water and nitrogen availability on photosynthesis and water use efficiency of Robinia pseudoacacia seedlings. *Journal of Environmental Sciences (China)* 25 (3):585–95. doi: 10.1016/S1001-0742(12)60081-3.

Lobo, A., I. Catarino, E. Silva, D. Centeno, and D. Domingues. 2022. Physiological and molecular responses of woody plants exposed to future atmospheric co2 levels under abiotic stresses. *Plants (Basel, Switzerland)* 11 (14):1880. doi: 10.3390/plants11141880.

Lobos, G., and J. Hancock. 2015. Breeding blueberries for a changing global environment: A review. *Frontiers in Plant Science* 6 (SEPTEMBER):782. doi: 10.3389/fpls.2015.00782.

Luo, L., Y. Zhang, and G. Xu. 2020. How does nitrogen shape plant architecture? *Journal of Experimental Botany* 71 (15):4415–27. doi: 10.1093/jxb/eraa187.

Mamatha, H., N. Srinivasa Rao, R. Laxman, K. Shivashankara, R. Bhatt, and K. Pavithra. 2014. Impact of elevated CO2 on growth, physiology, yield, and quality of tomato (Lycopersicon esculentum Mill) Cv. Arka Ashish. *Photosynthetica* 52 (4):519–28. doi: 10.1007/s11099-014-0059-0.

Matejovic, I. 1993. Determination of carbon, hydrogen, and nitrogen in soils by automated elemental analysis (dry combustion method). *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 24 (17-18):2213–22. doi: 10.1080/00103629309368950.

McCarthy, H., R. Oren, H. Johnsen, A. Gallet-Budynek, S. Pritchard, C. Cook, S. Ladeau, R. Jackson, and A. Finzi. 2010. Re-assessment of plant carbon dynamics at the duke free-air CO2 enrichment site: Interactions of atmospheric [CO2] with nitrogen and water availability over stand development. *The New Phytologist* 185 (2):514–28. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03078.x.

McDonald, G., W. Bovill, C. Huang, and D. Lightfoot. 2013. Nutrient use efficiency. In *Genomics and breeding for climate-resilient crops*. Vol. 2:333–93. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-37048-9_10.

Medina, S., R. Vicente, A. Amador, and J. L. Araus. 2016. Interactive effects of elevated [CO2] and water stress on physiological traits and gene expression during vegetative growth in four durum wheat genotypes. *Frontiers in Plant Science* 7 (NOVEMBER2016):1738. doi: 10.3389/fpls.2016.01738.

Michalski, R., and L. Kurzyca. 2014. Determination of nitrogen species (nitrate, nitrite and ammonia ions) in environmental samples by ion chromatography determination of nitrogen species (nitrate, nitrite and ammonia ions) in environmental samples by ion chromatography. *Polish Journal of Environmental Studies* 15 (July):5–18. http://www.pjoes.com/pdf/15.1/5-18.pdf.

Mndela, M., J. Tjelele, I. Madakadze, M. Mangwane, I. Samuels, F. Muller, and H. Pule. 2022. A global meta-analysis of woody plant responses to elevated CO2: Implications on biomass, growth, leaf n content, photosynthesis and water relations. *Ecological Processes* 11 (52):1–21. doi: 10.1186/s13717-022-00397-7.

Nunez, G., J. Olmstead, and R. Darnell. 2015. Rhizosphere acidification is not part of the strategy i iron deficiency response of vaccinium arboreum and the southern highbush blueberry. *HortScience* 50 (7):1064–9. doi: 10.21273/HORTSCI.50.7.1064.

O'Connor, R. C., D. M. Blumenthal, T. W. Ocheltree, and J. B. Nippert. 2022. Elevated CO2 counteracts effects of water stress on woody rangeland-encroaching species. *Tree Physiology* tpac150. doi: 10.1093/treephys/tpac150

Ortiz-Delvasto, N., P. Garcia-Gomez, M. Carvajal, and G. Bárzana. 2024. Aquaporins-mediated water availability in substrates for cannabis cultivation in relation to CBD yield. *Plant and Soil* 495 (1-2):469–85. doi: 10.1007/s11104-023-06341-8.

Pan, T., J. Ding, G. Qin, Y. Wang, L. Xi, J. Yang, J. Li, J. Zhang, and Z. Zou. 2019. Interaction of supplementary light and CO2 enrichment improves growth, photosynthesis, yield, and quality of tomato in autumn through spring greenhouse production. *HortScience* 54 (2):246–52. doi: 10.21273/HORTSCI13709-18.

Petridis, A., J. Van der Kaay, J. Sungurtas, S. Verrall, S. McCallum, J. Graham, and R. Hancock. 2020. Photosynthetic plasticity allows blueberry (Vaccinium corymbosum L.) plants to compensate for yield loss under conditions of high sink demand. *Environmental and Experimental Botany* 174 (March):104031. doi: 10.1016/j.envexpbot.2020.104031.

Poonnachit, U., and R. Darnell. 2004. Effect of ammonium and nitrate on ferric chelate reductase and nitrate reductase in Vaccinium species. *Annals of Botany* 93 (4):399–405. doi: 10.1093/aob/mch053.

Poorter, H., Y. Van Berkel, R. Baxter, J. Den Hertog, P. Dijkstra, R. Gifford, K. Griffin, C. Roumet, J. Roy, and S. Wong. 1997. The effect of elevated CO2 on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C3 species. *Plant, Cell & Environment* 20 (4):472–82. doi: 10.1046/j.1365-3040.1997.d01-84.x.

Primo-Millo, E., and M. Agustí. 2020. Charper 10: Vegetative growth. In *The Genus Citrus*, ed. M. Talon, M. Caruso, and F. Gmitter, 193–217. Woodhead Publishing. doi: 10.1016/B978-0-12-812163-4.00010-3.

Prior, S., H. Torbert, G. Runion, G. Mullins, H. Rogers, and J. Mauney. 1998. Effects of carbon dioxide enrichment on cotton nutrient dynamics. *Journal of Plant Nutrition* 21 (7):1407–26. doi: 10.1080/01904169809365492.

Purcell, C., S. Batke, C. Yiotis, R. Caballero, W. Soh, M. Murray, and J. McElwain. 2018. Increasing stomatal conductance in response to rising atmospheric CO2. *Annals of Botany* 121 (6):1137–49. doi: 10.1093/aob/mcx208.

Purvis, A., D. Peters, and R. Hageman. 1974. Effect of carbon dioxide on nitrate accumulation and nitrate reductase induction in corn seedlings. *Plant Physiology* 53 (6):934–41. doi: 10.1104/pp.53.6.934.

Roy, S., R. Kapoor, and P. Mathur. 2024. Revisiting changes in growth, physiology and stress responses of plants under the effect of enhanced CO2 and temperature. *Plant & Cell Physiology* 65 (1):4–19. doi: 10.1093/pcp/pcad121.

Sekhar K.M., Rachapudi V.S., Mudalkar S. and Reddy A.R. 2014. Persistent stimulation of photosynthesis in short rotation coppice mulberry under elevated CO2 atmosphere. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 137: 21–30. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.05.001

Shaheen, H., A. Mustafa, and A. Ulfat. 2022. Chapter 6: Crop production in response to elevated CO_2: Grain yield and quality. In *Sustainable Crop Productivity and Quality Under Climate Change*, ed. F. Liu, L. Xiangnan, P. Hogy, D. Jiang, M. Brestic, and B. Liu, 91–101. doi: 10.1016/B978-0-323-85449-8.00009-9.

Shanmugam, S., K. Kjaer, C. Ottosen, E. Rosenqvist, D. Kumari, and B. Wollenweber. 2013. The alleviating effect of elevated co2 on heat stress susceptibility of two wheat (Triticum aestivum L.) cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science* 199 (5):340–50. doi: 10.1111/jac.12023.

Smrke, T., R. Veberic, M. Hudina, D. Stamic, and J. Jakopic. 2021. Comparison of highbush blueberry (Vaccinium corymbosum l.) under ridge and pot production. *Agriculture (Switzerland)* 11 (10):929. doi: 10.3390/agriculture11100929.

Stitt, M., and A. Krapp. 1999. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: The physiological and molecular background. *Plant, Cell & Environment* 22 (6):583–621. doi: 10.1046/j.1365-3040.1999.00386.x.

Tamir, G., G. Afik, S. Zilkah, N. Dai, and A. Bar-Tal. 2021. The use of increasing proportions of N-NH4+ among the total applied inorganic N to improve acidification and the nutritional status and performance of blueberry plants in soilless culture. *Scientia Horticulturae* 276 (September 2020):109754. doi: 10.1016/j.scienta.2020.109754.

Taub, D., and X. Wang. 2008. Why are nitrogen concentrations in plant tissues lower under elevated CO2? a critical examination of the hypotheses. *Journal of Integrative Plant Biology* 50 (11):1365–74. doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00754.x.

Van der Kooi, C., M. Reich, M. Löw, L. De Kok, and M. Tausz. 2016. Growth and yield stimulation under elevated CO2 and drought: A meta-analysis on crops. *Environmental and Experimental Botany* 122Elsevier B.V.: :150–7. doi: 10.1016/j.envexpbot.2015.10.004.

Wei, Z., T. Du, X. Li, L. Fang, and F. Liu. 2018. Interactive effects of CO2 concentration elevation and nitrogen fertilization on water and nitrogen use efficiency of tomato grown under reduced irrigation regimes. *Agricultural Water Management* 202 (February):174–82. doi: 10.1016/j.agwat.2018.02.027.

Woodward, F. 2002. Potential impacts of global elevated CO2 concentrations on plants. *Current Opinion in Plant Biology* 5 (3):207–11. doi: 10.1016/S1369-5266(02)00253-4.

Wu, Y., L. Ma, L. Zhang, Y. Zhang, H. Zhou, Y. Wang, and Y. Liu. 2022. Photosynthetic carbon and nitrogen metabolism of Camellia oleifera abel during acclimation to low light conditions. *Journal of Plant Physiology* 278 (April):153814. doi: 10.1016/j.jplph.2022.153814.

Yang, H., Y. Wu, Y. Duan, C. Zhang, Z. Huang, W. Wu, L. Lyu, and W. Li. 2022. Metabolomics combined with physiological and transcriptomic analyses reveal regulatory features associated with blueberry growth in different soilless substrates. *Scientia Horticulturae* 302 (December 2021):111145. doi: 10.1016/j.scienta.2022.111145.

Yang, H., Z. Wei, Y. Duan, Y. Wu, C. Zhang, W. Wu, L. Lyu, and W. Li. 2023. Transcriptomic and metabolomic investigation of the adaptation mechanisms of blueberries to nitrogen deficiency stress. *Scientia Horticulturae* 321 (July):112376. doi: 10.1016/j.scienta.2023.112376.

Yelle, S., A. Gosselin, and M. Trudel. 1987. Effect of atmospheric CO2 concentration and root-zone temperature on growth, mineral nutrition, and nitrate reductase activity of greenhouse tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 112 (6):1036–40. doi: 10.21273/JASHS.112.6.1036.

Zárate, B., M. Alonso, V. Morales, A. Vásquez, P. Benito, and N. Arellanes. 2017. Physical and chemical characterization of pine bark for the production of blueberry (Vaccinium corymbosum L.) in containers. *Acta Horticulturae* 1180 (1180):503–10. doi: 10.17660/ActaHortic.2017.1180.71.

Zhang, C., C. Zhou, R. Burnap, and L. Peng. 2018. Carbon/Nitrogen metabolic balance: Lessons from cyanobacteria. *Trends in Plant Science* 23 (12):1116–30. doi: 10.1016/j.tplants.2018.09.008.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

En esta sección se proporciona una visión general e integradora de la Tesis Doctoral teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en los diferentes capítulos. Este trabajo de investigación aborda tres aspectos fundamentales en el estudio de la nutrición mineral y la calidad de producción de *Cannabis sativa L.* y *Vaccinium Corymbosum.:* Los cambios que provocan los diferentes componentes de sustratos sobre la fisiología, el crecimiento y la producción de Cannabidiol (CBD) del cannabis, identificando el sustrato más adecuado para su cultivo con el fin de aumentar la producción de metabolitos secundarios (Capítulo I), el estudio del efecto de sustratos con diferente composición sobre el desarrollo, contenido nutricional y producción del arándano y el cáñamo en condiciones de invernadero (Capítulo II), y la respuesta diferencial en el crecimiento y la producción del cultivo de arándanos ante la suplementación con CO_2 cuando se utilizan diferentes composiciones de sustratos (Capítulo III). A lo largo de estos capítulos, se han generado conocimientos que además de profundizar en la biología de estos cultivos, abren las puertas a la importancia de seleccionar sustratos adecuados con el fin de maximizar la producción y ofrecer nuevas técnicas aplicables en la agricultura actual que permitan una mayor producción y calidad de los cultivos, así como mayor valor nutraceútico.

La producción de diversos cultivos en sustrato sin suelo presenta una alta productividad desde el primer año de cultivo, ya que permiten mejorar la rizosfera de la planta al controlar las concentraciones de nutrientes, el contenido de humedad y limitar el estrés del suelo (Heller et al., 2022). No obstante, tanto la composición físico-química de los sustratos como la respuesta fisiológica de las plantas frente a la composición del sustrato, esta poco caracterizada. Por ello, uno de los objetivos en la presente Tesis Doctoral ha sido elucidar como el desarrollo, la respuesta fisiológica de la planta y la calidad de la producción se ve influenciada por la composición del sustrato, relacionando las características químicas y físicas de los sustratos con el crecimiento, el intercambio hídrico y la nutrición mineral de las plantas.

Los diferentes materiales utilizados en la composición del sustrato pueden beneficiar o afectar de manera directa el desarrollo de la planta. Estas mezclas con frecuencia contienen fibra de coco con mezclas de turba y/o perlita en distintas proporciones, pero nunca hasta la fecha se había realizado un análisis exhaustivo e integral de los efectos diferenciales de estas composiciones sobre la fisiología, bioquímica y biología molecular de las plantas, ni se había ahondado en si estos componentes son igualmente adecuados para la producción de plantas diferentes, como el arándano (Kingston et al., 2017) y el cannabis (Burgel et al., 2020).

3.1 Características físicas y químicas de los sustratos como factores fundamentales en el desarrollo y nutrición de las plantas

Uno de los factores fundamentales que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas es la disponibilidad de nutrientes, que está directamente relacionado con el pH del suelo (Barrow et al., 2023). En este contexto, es importante tener en cuenta el entorno evolutivo de las distintas especies, que generan preferencias por suelos más o menos ácidos (Van der Putten et al., 2013). Por ejemplo, se sabe que el rendimiento de las plantas de cannabis es más alto cuando el pH del suelo se sitúa entre 6.6-6.8 (Coffman et al., 1975) debido a la mayor disponibilidad de nutrientes necesarios para su alta demanda de crecimiento. Sin embargo, para el arándano el pH ideal es entre 4.5 y 5.5 y esto se debe a que las raíces del arándano son muy finas y carentes de pelos absorbentes, lo que limita su capacidad de absorber nutrientes en suelos con pH neutro o alcalino (Ramirez-Villacis et al., 2023).

El cannabis mostró preferencia por sustratos mezclados como los de fibra de coco (70%) con turba (30%), fibra de coco (70%) con perlita (30%) y, fibra de coco (60%) con turba (30%) y perlita (10%), que presentaron valores óptimos, mientras que los sustratos con mayor contenido en fibra de coco (fibra de coco 100%, fibra de coco 90% con perlita 10%), mostraron los valores más altos de pH en la solución filtrada, encontrándose por encima del pH óptimo para el crecimiento del cannabis. Si bien es cierto que durante nuestros ensayos el pH

disminuyó gradualmente en todos los percolados del sustrato, tal y como se ha descrito en otros estudios anteriores (Caplan et al., 2017b), permitiendo la supervivencia y crecimiento del cannabis.

Un aspecto importante es que el cannabis mostró una mayor capacidad de amortiguamiento fisiológico frente a fluctuaciones en las características químicas del sustrato. Esto puede deberse a una expresión más dinámica de transportadores de iones y mecanismos de adaptación nutricional, lo cual ha sido descrito en estudios recientes sobre la plasticidad fisiológica de esta especie. Asimismo, el cannabis toleró mejor condiciones de CE más altas que el arándano, lo cual sugiere diferencias importantes en los umbrales de sensibilidad a la salinidad entre ambas especies. De esta manera, al igual que el pH, la conductividad eléctrica (CE) de la solución de riego también ejerce una influencia en el crecimiento de las plantas, y se ha informado de una correlación negativa entre el crecimiento de las plantas y la CE en el cáñamo (Anderson et al., 2021). El sustrato compuesto por fibra de coco (100%) mostró la CE más alta (2,5mS cm^{-1}) en comparación con los demás, seguido del sustrato 90% fibra de coco: 10% de perlita (1,5mS cm^{-1}) y , a pesar de que todas las plantas fueron regadas con la misma disolución nutritiva, las plantas crecidas en sustratos compuesto por un mayor porcentaje de fibra de coco, tuvieron una conductividad eléctrica (CE) más alta en comparación con los demás, por ende, esta diferencia en la CE se asoció con la diferente composición del sustrato. Investigaciones posteriores, respaldan la importancia de que los niveles iniciales de pH y CE pueden servir como indicadores preliminares para seleccionar mezclas de medios de cultivo óptimos, pero no son el único factor de éxito a largo plazo (Yang et al., 2025).

En el caso del arándano, Desde el punto de vista químico las plantas prefieren los suelos ácidos y, tal y como ocurrió en el capítulo I, los experimentos con sustrato revelaron que los sustratos compuestos por fibra de coco (100%) tenían un pH y CE mayor, lo cual afectaría negativamente al desarrollo de estas plantas. Sin embargo, se ha demostrado que la fibra de coco es adecuada para la producción de plantas ericáceas en contenedores (Scagel, 2003), por lo que, para mitigar el aumento del pH, se realizaron ajustes de pH a la disolución nutritiva

con ácido clorhídrico (0.001N). Así mismo, el sustrato compuesto por fibra de coco (100%) presentaba altas concentraciones de sodio, que se redujeron con lavados antes de iniciar los experimentos, dando como resultado un sustrato con características idóneas para el cultivo de arándano (Capítulo II, Capitulo III). En definitiva, si se realizan lavados al sustrato compuesto por fibra de coco, se reducirá la concentración de sodio y se ajustarán los valores de pH y CE, por lo que tendremos un sustrato adecuado para el cultivo de arándano. Estas diferencias en los resultados de pH y CE se entienden desde una perspectiva fisiológica, observando que, *Vaccinium corymbosum L.* es altamente sensible al pH, mientras que *cannabis sativa L.* puede prosperar en un rango más amplio, gracias a sistemas de absorción radicular más eficientes y adaptativos. Adicionalmente, también en arándano, se observó que el sustrato con perlita mostro mejor estructura física bajo enriquecimiento con CO_2, permitiendo mayor aireación, lo que es fundamental bajo condiciones de mayor demanda fotosintética como ocurre en ambientes enriquecidos con CO_2. La literatura apoya este hallazgo, ya que estudios como el de Kingston et al., (2020) han demostrado que la incorporación de perlita mejora el crecimiento de arándanos al mantener una adecuada oxigenación del sistema radicular.

Otro factor a considerar, es la composición mineral de los sustratos que se encuentra ligada al origen del material (Atzori et al., 2021). En nuestros resultados para el cultivo de cannabis (Capítulo I), encontramos que, los sustratos compuestos con mayor contenido en fibra de coco fibra de coco tuvieron mayores concentraciones de sodio (Na), calcio (Ca) y Fe, resultados que atribuimos al origen de la fibra de coco. Por su parte, el sustrato compuesto por fibra de coco (60%) con turba (30%) y perlita (10%), presento las mayores cantidades de Mg, cobre (Cu), manganeso (Mn) y zinc (Zn). Estudios posteriores demuestran que la fibra de coco y el biocarbón contienen un alto contenido de cationes básicos y amplia área superficial cargada negativamente, que mejoran la capacidad de adsorción y retención electrostática de Ca^{2+} y otros cationes y permite que los nutrientes puedan liberarse lentamente para su uso por parte de la planta (Eisa et al., 2025; Tang et al., 2024). De igual modo, el sustrato fibra de coco (100%) para el cultivo de arándano (Capítulo II, capitulo III), tiene mayor capacidad de

retención de nutrientes, resultando en mayores concentraciones de N y Fe. En definitiva, la selección del sustrato debe considerar no solo el pH y la conductividad eléctrica, sino también la composición mineral y su capacidad para liberar nutrientes de manera eficiente para el crecimiento.

Además, como hemos mencionado a lo largo de esta tesis, la distinta composición de los sustratos conduce a diferentes capacidades de retención de agua y nutrientes, generando un impacto en la fisiología de las plantas (Kim et al., 2011). Así, la nutrición mineral de una planta se refleja en gran medida en el contenido de nutrientes presentes en sus hojas. Diversos estudios han evidenciado que la absorción de nutrientes y el crecimiento vegetal están estrechamente modulados por las propiedades físicas del sustrato (Raviv et al., 2004; Soong et al., 2020). Los resultados obtenidos en nuestros ensayos evidencian que la respuesta a estos sustratos es altamente específica y varía entre las especies, lo que permite dilucidar mecanismos diferenciados de absorción y transporte de nutrientes.

En nuestro estudio se encontraron diferencias significativas en la absorción de nutrientes en función de la combinación de fibra de coco, turba y perlita, mostrando cómo cada especie responde de manera particular a las condiciones del sustrato. En cuanto a la acumulación de P en las hojas, en plantas de cannabis cultivadas bajo diferentes composiciones de sustrato (Capítulo I) no se evidenció mayor acumulación de este nutriente cuando se cultivó en sustrato compuesto por fibra de coco (100%). En contraste, en arándano (Capitulo II), se reveló que el contenido mineral en hojas, mostró valores más altos de P en las plantas cultivadas con sustrato de fibra de coco (100%) en comparación con otras combinaciones de sustrato. Este hallazgo es congruente con estudios previos en otras especies, como el tomate, donde se ha demostrado una mayor concentración de P en los brotes cuando se cultivaban en fibra de coco que en un sustrato de turba-vermiculita (Xing et al., 2019). Dicho contraste, pone en manifiesto que cada especie tiene diferentes mecanismos de absorción de nutrientes que responden de manera diferenciada a las condiciones del sustrato.

Resulta relevante destacar que, en ambas especies (cannabis y arándano), las plantas crecidas en sustratos compuestos por fibra de coco (100%) y mezclas fibra de coco (90%) con perlita (10%) presentaron los niveles más bajos de Fe y Mn en hojas, a pesar de que el sustrato contenía altas concentraciones de Fe en forma disponible, lo que sugiere que otros factores del medio, como el pH y la conductividad eléctrica (CE) de la solución del sustrato, interfieren significativamente en la disponibilidad y absorción de estos nutrientes para la planta. En el caso del cannabis, la relación del pH del percolado y la concentración de Fe en las hojas fue especialmente marcada, confirmando que la disponibilidad de Fe depende fuertemente del pH (Kim et al., 2007) y la correlación entre el pH en el percolado del sustrato y el contenido de Fe en las hojas fue clara en nuestros resultados. La interacción entre la composición del sustrato y la absorción de nutrientes también se extendió a otros cationes esenciales. En este sentido, observamos que las plantas de cannabis crecidas en sustrato que combinan fibra de coco (70%) con turba (30%) o mezclas de fibra de coco (60%) con turba (30%) y perlita (10%), mostraron una recuperación en la absorción tanto del Fe como Ca, cuando estos cationes estaban disponibles. Esta mejora, se puede atribuir a que estos sustratos parecen favorecer la movilización y el transporte de cationes, posiblemente mediado por un incremento en la transpiración. Además, elevados niveles de transpiración, facilitan el transporte vía apoplástica de Fe y Ca hacia las hojas, una hipótesis apoyada por investigaciones que han resaltado el papel del flujo del agua en la absorción y distribución de nutrientes (Kumar et al., 2015; Pathak et al., 2021).

Un hallazgo paradójico se presentó en el comportamiento del boro en las plantas de cannabis. En este caso, las plantas cultivadas en sustrato fibra de coco (90%) con perlita (10%) exhibieron la mayor acumulación de B en las hojas, aun cuando este medio presentaba la menor concentración inicial del nutriente. Este fenómeno sugiere la existencia de un mecanismo compensatorio en el que, ante la baja disponibilidad inicial, la planta optimiza la absorción y el transporte del boro para mantener la homeostasis nutricional. Por el contrario, en el caso del arándano, se observó que la mayor acumulación de B ocurrió en sustratos con una mayor disponibilidad inicial de este nutriente, lo que apunta a una capacidad regulatoria

menos eficiente en comparación con el cannabis. Estas diferencias resaltan la importancia de considerar las características inherentes a cada especie al momento de seleccionar el sustrato y diseñar estrategias nutricionales específicas.

También, en el caso del cannabis, se identificó que el sustrato compuesto por fibra de coco (70%) con perlita (30%) mostró los valores más altos de potasio (K), fósforo (P), boro (B), cobre (Cu) y manganeso (Mn), junto con una considerable cantidad de agua de reserva (RW). No obstante, la alta proporción de perlita presente en este sustrato probablemente favorece la retención del agua y de ciertos nutrientes en el propio medio, limitando su disponibilidad para la absorción por parte de la planta. Como consecuencia, tanto el contenido de nutrientes en hojas como en inflorescencias se vio reducido, lo cual se correlacionó con un menor crecimiento en comparación con plantas cultivadas en sustratos que combinan fibra de coco (70%) con turba (30%) o mezclas que incorporan fibra de coco (60%), turba (30%) y perlita (10%).

La acumulación de nutrientes en las inflorescencias representa un indicador fundamental del estado nutricional de las plantas durante la fase reproductiva, y su análisis permite establecer relaciones directas entre el tipo de sustrato, la dinámica hídrica y la eficiencia en la absorción mineral. En este sentido, se observó que las plantas cultivadas en sustratos fibra de coco (70%) con turba (30%) y fibra de coco (60%) con turba (30%) y perlita (10%), así como aquellas en sustrato fibra de coco (90%) con perlita (10%), presentaron mayores niveles de acumulación de nutrientes. Por el contrario, las plantas crecidas en sustratos fibra de coco (70%) con perlita (30%) y en aquellos con fibra de coco (100%) mostraron un contenido global de nutrientes significativamente menor, destacándose las concentraciones reducidas de Ca, magnesio (Mg) y Cu en las primeras. Estos hallazgos refuerzan la idea de que la movilidad y disponibilidad de los nutrientes está fuertemente influenciada por el movimiento del agua en el sustrato, sugiriéndose que una mayor retención hídrica puede limitar la absorción efectiva en las etapas tanto vegetativas como reproductivas.

Por consiguiente, la relación entre la dinámica hídrica del sustrato y la eficiencia en la nutrición vegetal se hace evidente a partir de estos hallazgos. Una mayor retención de humedad podría generar condiciones de saturación que interfieren con la oxigenación radicular y el transporte eficiente de solutos desde la raíz hacia los tejidos aéreos (Arablousabet et al., 2024). Del mismo modo, un sustrato con escasa capacidad de retención puede inducir estrés hídrico intermitente, reduciendo la eficiencia del transporte por el xilema y, por ende, la acumulación de nutrientes en tejidos clave como las inflorescencias. En conjunto, estos datos respaldan la hipótesis de que no solo la composición química del sustrato, sino también sus propiedades físicas, influyen significativamente en la nutrición mineral durante el desarrollo reproductivo.

En relación con lo anterior, en las plantas de arándano (Capítulo II), el Ca, B y Mn de las plantas cultivadas en sustrato fibra de coco (70%) con turba (30%) mostraron concentraciones más altas gracias a una mayor disolución y lixiviación en el sustrato, que incrementó su disponibilidad en la solución nutritiva. A mayor presencia de nutrientes en forma disuelta, mayor es la disponibilidad de absorción por parte de las raíces, a pesar de que este fenómeno reduzca la retención intrínseca del sustrato. Así, estos resultados apoyan la idea de que la medición del drenaje previo a la plantación podría ser una buena técnica para conocer las posibles necesidades de fertiirrigación de un suelo específico.

Un caso particular es el del efecto del incremento de CO_2 en cuanto a la disponibilidad y capacidad de absorción de otros nutrientes. Es bien sabido que el aumento en el rendimiento causado por el CO_2 elevado puede reducir la calidad mineral en las partes comestibles de los cultivos (Dong et al., 2018). En nuestro caso, bajo elevadas condiciones de CO_2 se observó una reducción de K, S y B en el fruto de arándano, aunque en baja medida. El nitrógeno total (N total) en nuestro estudio (Capitulo III) sin embargo, no mostró variaciones significativas en condiciones de CO_2 elevado en comparación con las condiciones de control (CO_2 ambiental), e incluso la concentración de N total en los frutos aumentó en las plantas cultivadas en un sustrato fibra de coco (100%) bajo estas condiciones. Este comportamiento puede atribuirse a la alta capacidad de retención de agua y buena

aireación de la fibra de coco, lo que favorece una mayor disponibilidad de nutrientes para la planta y facilita la rápida translocación de nitrógeno al fruto (Ortiz-Delvasto et al., 2023).

Otro factor a considerar en relación con la nutrición del arándano, es la preferencia de absorción de N, ya que, diversas investigaciones sugieren que las plantas de arándanos tienen preferencia por amonio (NH_4^+) en lugar de nitrato (NO_3^-), quizá, debido a un mecanismo evolutivo resultante de la adaptación de los arándanos a hábitats caracterizados por suelos ácidos, donde el amonio es el ion N inorgánico más abundante disponible (Bryla et al., 2015). No obstante, no es claro si las plantas de arándano presentan mejor rendimiento en altas concentraciones de NH_4^+ debió a una mayor absorción de N o a una mayor absorción de microelementos como Fe, Mn o Zn, que son más accesibles a un pH bajo de la rizosfera (Tamir et al., 2021). Por consiguiente, para evitar afectar a la absorción de microelementos, en nuestro ensayo utilizamos NO_3^- como principal fuente de N evidenciándose altas tasas de absorción posiblemente debido al ajuste del pH de la solución nutritiva, que al ser bajo favoreció la disponibilidad y solubilidad de micronutrientes como el manganeso (Mn) y el zinc (Zn), en las hojas de plantas cultivadas en los sustratos fibra de coco (100%) y fibra de coco (90 %) con perlita (10 %).

Respecto al efecto que tuvo el CO_2, nuestros resultados revelaron una limitación generalizada en la concentración de NO_3^- foliar en plantas de arándano cultivadas en todos los sustrato sometidas a elevadas concentraciones de CO_2 (capitulo III). Este hallazgo coincide con estudios previos que reportan una disminución en la concentración de NO_3^- en plantas de maíz (Purvis et al., 1974), tomate (Yelle et al., 1987), trigo (Adavi et al., 2021) cultivadas en condiciones elevadas de CO_2. Por el contrario, independientemente del sustrato, se observó un aumento en la concentración de Nitrito (NO_2^-) tanto en hojas como en frutos en condiciones de CO_2 elevado, probablemente por una limitación en la conversión de nitrito a amonio, donde se ve reducida la actividad de la nitrito reductasa, permitiendo una mayor acumulación de NO_2^-. Por consiguiente, en conjunto, estos cambios en la concentración de NO_3^- y NO_2^- pueden indicar que un alto nivel de

CO_2 puede provocar un desequilibrio en la asimilación de nitrógeno que debe tenerse en consideración a la hora de aplicar este tipo de estimulación.

3.2 Las relaciones hídricas de la planta se ven influenciadas por la composición del sustrato.

Las relaciones hídricas son un factor crucial para el desarrollo de la planta de especies de alto valor agronómico como el cannabis y el arándano, donde la eficiencia en el uso del agua, la transpiración y el crecimiento están estrechamente vinculados a las características del sustrato, e interfieren enormemente en la disponibilidad de agua para ser absorbida por las plantas. En este contexto, la conductancia estomática (gs) y transpiración en las plantas parecen estar directamente relacionadas con la absorción de agua y el crecimiento general de la planta.

En el estudio con cannabis (Capítulo I), se observó que los sustratos con mayor proporción de fibra de coco (60%) combinada con turba (30%) y perlita (10%) ofrecieron una mayor cantidad de agua fácilmente disponible (AW) y menor proporción de agua no disponible (UAW), lo que se tradujo en un crecimiento más vigoroso, mayor número de hojas, una alta eficiencia del fotosistema II (PSII) y una mayor producción de inflorescencias. Esta disponibilidad hídrica favoreció el transporte de agua por la vía apoplástica, un mecanismo pasivo y eficiente que no requiere una alta regulación molecular para mantener el flujo hídrico. Sin embargo, al disminuir la proporción de turba o eliminarla completamente, como en fibra de coco pura o fibra de coco con perlita, la fracción de agua fácilmente disponible disminuyó significativamente, incrementando la proporción de agua de reserva o no disponible. Esta menor disponibilidad hídrica obligó a las plantas a activar mecanismos compensatorios para sostener el transporte de agua hacia los órganos en crecimiento, especialmente las hojas y las inflorescencias. Cuando la disponibilidad de agua de los sustratos fue menor en sustratos con ausencia de turba, la transpiración de las plantas de cannabis disminuyó, lo que sugiere la presencia de estrés hídrico, reduciendo la vía apoplástica de transporte de agua (Aroca et al., 2007), y que

además, ocasiono el "espigado" de estas plantas, tal y como sucede en plantas como lechuga o la col china donde los factores abióticos externos pueden inducir el espigado temprano (Loarca et al., 2024; Soorni et al., 2023). En este contexto, se observó una mayor expresión de genes de acuaporinas, en particular del subgrupo PIP (Plasma membrane Intrinsic Proteins), lo cual sugiere una intensificación del transporte de agua por la vía simplástica a través de membranas celulares. Esta vía se vuelve relevante cuando la ruta apoplástica no es suficiente para sostener la demanda hídrica, tal como ocurre en condiciones de estrés hídrico moderado inducido por el sustrato. La expresión de PIP2.2, PIP2.3 y PIP2.7 fue significativamente mayor en plantas cultivadas en fibra de coco (90%) con perlita (10%), coincidiendo con una condición hídrica más restrictiva del sustrato, en la que predominó el transporte de agua mediado por proteínas de membrana (Li et al., 2015; Li et al., 2021; Zhang et al., 2020). Esta respuesta se acompañó de un mayor contenido foliar de micronutrientes que también pueden movilizarse en conjunto con el flujo hídrico a través de las acuaporinas, indicando una interacción entre la regulación del transporte de agua y nutrientes. Además, la mayor expresión de estas acuaporinas coincidió con una reducción de la eficiencia fotosintética y del contenido de clorofila, lo que indica que, si bien el transporte de agua fue mantenido gracias a la activación de estas proteínas, no fue suficiente para compensar completamente los efectos del estrés generado por la disminución de disponibilidad de agua del sustrato. La expresión de PIP1.4, por su parte, presentó una expresión significativamente mayor en condiciones de menor disponibilidad de agua, lo cual se alinea con su función previamente descrita en la regulación de la apertura estomática y la respuesta antioxidante bajo estrés hídrico. Este patrón sugiere que su activación es parte de una respuesta de defensa más que de crecimiento. En contraste, la expresión de PIP2.1 se asoció con sustratos que favorecieron el desarrollo reproductivo (mayor producción de inflorescencias y contenido de CBD), indicando un posible papel de esta acuaporina en el transporte eficiente de agua y solutos hacia estructuras reproductivas en condiciones hídricas más favorables.

En conjunto, estos hallazgos muestran una clara conexión entre las propiedades hídricas del sustrato y la regulación de las acuaporinas en cannabis.

En sustratos con alta disponibilidad de agua, las plantas pueden depender principalmente del transporte por la vía apoplástica, lo que reduce la necesidad de una elevada expresión de acuaporinas. En cambio, en condiciones donde el sustrato limita el acceso al agua, como en tratamientos con alta proporción de fibra de coco, las plantas compensan mediante una mayor expresión de acuaporinas para mantener la turgencia celular y el transporte de nutrientes. Este cambio en la vía predominante de transporte hídrico representa un ajuste fisiológico clave para sostener el crecimiento y la productividad bajo diferentes escenarios de disponibilidad de agua impuesta por el tipo de sustrato.

En el arándano también encontramos una fuerte relación entre el sustrato, la respuesta hídrica de la planta y el crecimiento. Se sabe que las plantas de arándano cultivadas con sustrato fibra de coco (100%) presentan el mayor número de estomas por mm^2, aunque menor conductancia estomática que las plantas cultivadas en sustratos fibra de coco con turba (Ortiz-Delvasto et al., 2023). En este sentido, observamos que, al aumentar el CO_2, las plantas de arándano (Capitulo III) crecidas en sustrato compuesto por fibra de coco (100%) tuvieron la capacidad de aumentar la conductancia estomática (gs). En consecuencia, las mediciones en plantas leñosas demuestran que la gs podrían aumentar en respuesta a niveles elevados de CO_2, aunque dependiendo de la disponibilidad de agua en el sustrato (Purcell et al., 2018) y, como hemos visto, de la anatomía de la hoja y su contenido en estomas. De igual forma, cuando las plantas de arándano fueron sometidas a condiciones elevadas de CO_2, la tasa de fotosíntesis neta (An), la conductancia estomática (gs) y la concentración interna de CO_2 (Ci) aumentaron en todas las plantas independientemente del sustrato, pero se evidenció el mayor crecimiento y mayores valores de la tasa fotosintética en las plantas cultivadas en sustrato con mayor cantidad de fibra de coco, que brindó capacidad de retener más agua y mayor aireación en comparación con otros sustratos, lo que confirma que la composición del sustrato es básica para modular la respuesta a cambios ambientales dependiendo de las necesidades específicas de cada planta (Gómez-Bellot et al., 2020) y esto tuvo una influencia directa en el crecimiento del arándano.

Desde la perspectiva del comportamiento hídrico, los hallazgos revelados permiten distinguir dos fases diferenciales según las condiciones ambientales. En un escenario de condiciones ambientales normales, la fibra de coco, debido a su estructura porosa, favorece un intercambio gaseoso adecuado y retiene la cantidad de agua necesaria para sostener el metabolismo y el crecimiento de las plantas de arándano. Sin embargo, bajo condiciones de CO_2 elevado, se evidencia una pérdida parcial de la funcionalidad de la fibra de coco (Ortiz-Delvasto et al., 2025). Estudios recientes indican que la exposición prolongada a niveles altos de CO_2 puede inducir una reducción en la transpiración estomática, lo que altera la dinámica de absorción de agua y la capacidad de sustratos altamente porosos para mantener un equilibrio hídrico (Kirschbaum et al., 2018). Esta disminución de la transpiración conlleva a una menor eficiencia en la absorción de agua, afectando negativamente el rendimiento del sustrato cuando se basa exclusivamente en fibra de coco.

En este sentido, al evaluar la eficiencia en el uso del agua (WUE) y la eficiencia en el uso de nutrientes (NUE) en plantas de arándano, se encontraron diferencias importantes entre las plantas cultivadas en sustrato con de fibra de coco pura y aquellas que contenían mezclas con turba o perlita. En condiciones de CO_2 elevado, los sustratos que incluyeron combinaciones de fibra de coco con turba o perlita mostraron una mayor eficacia tanto para el uso eficiente del agua (WUE) como para el uso eficiente de nutrientes (NUE). Este hallazgo se puede interpretar como una respuesta adaptativa de las plantas, que en presencia de altos niveles de CO_2 y, por ende, de una mayor demanda de carbono para sostener el crecimiento acelerado, se ven obligadas a optimizar el equilibrio entre la adquisición de agua y otros nutrientes esenciales para la síntesis de biomoléculas. La incorporación de turba y perlita mejora las características físicas del sustrato, incrementando la capacidad de intercambio catiónico y la capilaridad, lo cual facilita la adsorción y disponibilidad de compuestos esenciales para el crecimiento.

De manera complementaria, se ha evidenciado que la respuesta de las plantas de arándano ante el incremento en la concentración atmosférica de CO_2

está mediada por diversos factores, donde la anatomía foliar, la densidad de estomas y la funcionalidad del sustrato interactúan de forma simultánea. La mayor densidad de estomas en las plantas cultivadas en sustrato fibra de coco (100%), aunque aparentemente ventajosa, se ve contrarrestada por una reducción en la eficacia de la conductancia estomática bajo ciertas condiciones, lo que limita el potencial beneficioso del efecto de fertilización del CO_2. En contraste, la combinación de fibra de coco con turba o perlita ofrece una sinergia que permite optimizar no solo el suministro de agua y nutrientes, sino también la eficiencia en la respuesta fotosintética, lo que se traduce en un crecimiento superior y una mayor resiliencia frente a los cambios ambientales.

3.3 La respuesta de los metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios cada vez adquieren mayor importancia en industrias farmacéuticas, de colorantes y la alimentaria, incrementando la necesidad de métodos fiables y eficientes para obtener estos compuestos (Reshi et al., 2023). En nuestro ensayo observamos una correlación interesante entre los resultados obtenidos en el cultivo de cannabis, tanto para la producción de CBD como para la producción de biomasa (Capítulo I y capítulo II), así como para arándanos (capitulo II y III), especialmente en lo que respecta al crecimiento de las plantas y la producción de metabolitos secundarios. Ambos cultivos han mostrado que el crecimiento vegetativo está fuertemente influenciado por factores ambientales y nutricionales, lo que sugiere que un manejo agronómico adecuado puede optimizar el desarrollo de las plantas y, por ende, su rendimiento y calidad.

La correlación positiva entre el crecimiento y la producción de metabolitos en ambos cultivos sugiere que un enfoque holístico que integre el manejo agronómico con el conocimiento de la genética de las plantas puede ser clave para maximizar el rendimiento. En el caso del cannabis, la optimización de las condiciones de cultivo no solo mejora el crecimiento, sino que también puede aumentar la concentración de CBD, siendo las plantas cultivadas en sustrato fibra de coco (70%) y turba (30%), y fibra de coco (60%), turba (30%) y perlita (10%), las que presentaron los niveles altos de CBD y los mejores parámetros de

crecimiento, mientras que las plantas crecidas en sustrato compuesto por fibra de coco (90%) con perlita (10%), mostraron la menor producción de inflorescencias, contenido de CBD y desarrollo general. Estos resultados se traducen en que las plantas cultivadas en condiciones óptimas destinaron más recursos energéticos a la producción de metabolitos secundarios y producción de biomasa. Esta respuesta es consistente con la literatura, que indica que, en ausencia de restricciones fisiológicas, las plantas pueden priorizar rutas metabólicas asociadas con compuestos especializados. No obstante, se detectó una mayor concentración de CBD en plantas cultivadas en sustrato compuesto exclusivamente por fibra de coco. Este hallazgo resulta especialmente relevante si se considera que los cannabinoides como el CBD pueden incrementarse en respuesta a condiciones de estrés hídrico, como lo han demostrado estudios recientes (Kostanda et al, 2022). Es importante destacar que el estrés hídrico, inducido por las propiedades físicas del sustrato, puede activar mecanismos fisiológicos que promueven la síntesis de compuestos secundarios, como parte de una estrategia adaptativa frente a condiciones adversas (Kleinwächter et al., 2015). De este modo, las plantas cultivadas en fibra de coco al 100% probablemente experimentaron mayor estrés por limitaciones en la disponibilidad de agua, lo cual derivó en un aumento en la acumulación de cannabinoides.

Por su parte en el arándano, bajo condiciones ambientales controladas y mediante el uso adecuado de fertilizantes, se pudo comprobar que los sustratos evaluados no redujeron significativamente las concentraciones de antocianinas en el fruto. Este hallazgo sugiere que, al menos en escenarios bien manejados, la composición del sustrato no tiene por qué tener un impacto directo en la síntesis de estos metabolitos, permitiendo así mantener su valor nutracéutico y facilitando su aprovechamiento en sistemas de producción intensiva. No obstante, cuando se evaluó la respuesta productiva del arándano bajo condiciones elevadas de dióxido de carbono, se observaron diferencias notables en función del tipo de sustrato. Particularmente, las plantas cultivadas en la mezcla de 90% fibra de coco y 10% perlita registraron la mayor producción de frutos, lo cual podría estar asociado a una mayor disponibilidad de oxígeno en el sistema radicular, mejor retención de

agua o una optimización en el transporte y asimilación de nutrientes bajo condiciones de CO_2 enriquecido.

OBSERVACIONES FINALES

En conjunto, los resultados de esta Tesis Doctoral subrayan el papel estratégico del sustrato como modulador clave en la interacción planta-medioambiente, especialmente bajo escenarios de cambio climático y atmósferas enriquecidas en CO_2. Más allá de su función como soporte físico, el sustrato influye directamente en procesos fisiológicos esenciales como la absorción de agua, el transporte de nutrientes y la acumulación de metabolitos secundarios. Por lo tanto, como líneas de investigación futuras, sería relevante profundizar en el estudio de las interacciones entre las propiedades físico-químicas del sustrato, la microbiota rizosférica y la expresión de genes relacionados no solo con acuaporinas, sino también con transportadores específicos de nutrientes (por ejemplo, NRT, AMT, PHT, o ZIP), cuya regulación puede estar influenciada por la disponibilidad hídrica y la composición del medio de cultivo.

Asimismo, se debería prestar especial atención al efecto del sustrato sobre la arquitectura radicular, considerando que la porosidad, densidad aparente y retención de agua afectan directamente al desarrollo del sistema radicular, lo que condiciona la eficiencia de absorción y la exploración del volumen de suelo. Evaluar cómo estos factores interactúan bajo condiciones de estrés (hídrico, salino o térmico) permitiría identificar combinaciones de sustratos que optimicen la resiliencia del cultivo. El uso combinado de herramientas fisiológicas, moleculares y metabolómicas permitirá diseñar estrategias de manejo más sostenibles y adaptadas a distintos escenarios edafoclimáticos. Además, transferir estos resultados a escalas comerciales podría abrir nuevas oportunidades para el desarrollo de protocolos personalizados de manejo del sustrato, específicos para cada especie, variedad y condición ambiental, incrementando así la eficiencia y sostenibilidad en la producción de cultivos de alto valor como *Vaccinium corymbosum* L. y *Cannabis sativa* L. Proporcionando así una base sólida para comprender los mecanismos fisiológicos y moleculares involucrados en la respuesta de las plantas a diferentes condiciones de sustrato y ambiente, lo cual respalda el diseño de nuevas estrategias productivas. Esta comprensión no solo es relevante desde una perspectiva académica, sino que también ofrece herramientas aplicables en el ámbito empresarial, facilitando el desarrollo de tecnologías

agronómicas más eficientes, la selección de materiales de cultivo adaptados a contextos específicos y la toma de decisiones basada en evidencia científica para maximizar el rendimiento, la calidad y la sostenibilidad de los sistemas de producción.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, se han extraído las siguientes conclusiones en relación a los objetivos establecidos, siendo consideradas las más relevantes del trabajo:

I. La composición del sustrato (aun en pequeñas concentraciones) condiciona sus propiedades físico-químicas y esto tiene gran influencia sobre el desarrollo fisiológico, nutricional y metabólico de especies de interés agronómico y medicinal como *Vaccinium corymbosum L.* y *Cannabis sativa L.*

II. La propiedad del AW (agua disponible) y espacio aéreo de los sustratos, condicionan directamente la retención de agua, la aireación radicular y la disponibilidad de nutrientes, factores que inciden en la eficiencia fotosintética, el crecimiento vegetativo y la producción de metabolitos secundarios en ambos cultivos de arándano y cáñamo.

III. La fibra de coco demostró ser la composición que más incrementa el espacio aéreo y la WA (agua disponible) favoreciendo un equilibrio hídrico y nutricional adecuado para ambas especies. Sin embargo, es un componente que requiere que se apliquen tratamientos de acondicionamiento previos que reduzcan los niveles de NaCl.

IV. La nutrición mineral debe adaptarse de manera diferenciada a las exigencias fisiológicas de cada cultivo. En el caso del arándano, su preferencia por fuentes amoniacales de nitrógeno, reveló que la composición de sustrato (fibra de coco 70% y turba 30%) favoreció la capacidad de intercambio catiónico e incrementando la concentración de cationes. Sin embargo, en cannabis la composición de sustrato (fibra de coco 60% con turba 30% y perlita

10%) mejoró la retención de humedad y facilitó una liberación más gradual de nutrientes, lo que se tradujo en una mayor eficiencia en la absorción del nitrógeno durante las fases críticas del desarrollo vegetativo y reproductivo.

V. El aumento de CO_2 atmosférico mejoró significativamente el rendimiento fisiológico del arándano, incluyendo la eficiencia en el uso del agua y nutrientes. Sin embargo, el sustrato jugó un rol determinante en la absorción mineral, siendo más idóneos el sustrato (fibra de coco 70% y turba 30%) y (fibra de coco 90% y perlita 10%) por su capacidad de mejorar la disponibilidad nutricional.

VI. El enriquecimiento atmosférico a 1000 ppm de CO_2 representa una estrategia agronómica eficaz para mejorar la tasa fotosintética y la productividad del arándano. Sin embargo, exposiciones prolongadas deben ir acompañadas de un suministro hídrico y nutricional equilibrado, ya que podrían inducir mecanismos de aclimatación que afecten negativamente la eficiencia metabólica y la calidad del fruto.

VII. El papel de las acuaporinas, fundamental en la gestión del transporte de agua y solutos a través de membranas celulares, se destaca en los diferentes sustratos en el cultivo del cannabis. En este sentido PIP1.4 (acuaporina descrita para responder en estrés hídrico) presenta mayor expresión en los sustratos con bajos valores de AW (agua disponible), es decir en fibra de coco (70%) con perlita (30%), fibra de coco (100%) y fibra de coco (90%) con perlita (10%). Por otro lado, la acuaporina PIP2.3 aparece más expresada en los sustratos fibra de coco (90%) con perlita (10%) y fibra de coco (60%), turba (30%) y perlita (10%), proporcionando mayor aporte de agua a las plantas, lo que coincide con mayor crecimiento, sin

embargo, no se detectó relación con las características de los sustratos.

VIII. Las condiciones del sustrato afectan significativamente la composición de metabolitos secundarios únicamente en cannabis. Se observó que las combinaciones específicas como fibra de coco (60%), turba (30%) y con perlita (10%) y fibra de coco (100%) favorecieron la acumulación de CBD en cannabis, evidenciando que las características físico-químicas del sustrato de cultivo modula rutas biosintéticas de forma específica como son una baja porosidad en fibra de coco (60%), turba (30%) y con perlita (10%) y bajo AW en fibra de coco (100%).

IX. Finalmente, ya que el cultivo sin suelo se presenta como una alternativa tecnológica viable para la producción eficiente y sostenible de especies agrícolas, la elección de la composición específica del sustrato debe ser elegida para cada especie, ambiente y especificaciones finales del cultivo.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

From the results obtained in this PhD thesis, the following conclusions have been drawn in relation to the established objectives, being considered the most relevant findings of the study:

I. The composition of the substrate (even at low concentrations) determines its physico-chemical properties, which in turn exert a significant influence on the physiological, nutritional, and metabolic development of agronomically and medicinally important species such as Vaccinium corymbosum L. and Cannabis sativa L.

II. The properties of available water (AW) and air space in substrates directly affect water retention, root aeration, and nutrient availability factors that critically influence photosynthetic efficiency, vegetative growth, and secondary metabolite production in both blueberry and hemp crops.

III. Coconut fiber was shown to be the substrate component that most effectively increases air space and available water, thereby promoting a favourable water and nutrient balance for both species. However, this material requires prior conditioning treatments to reduce its NaCl content.

IV. Mineral nutrition must be tailored to the physiological demands of each crop. In the case of blueberry, its preference for ammonium-based nitrogen sources revealed that the substrate composition (coconut fiber 70% and peat 30%) favoured cation exchange capacity and increased cation concentrations. However, in cannabis the substrate composition (coconut fiber 60%, peat 30%, and perlite 10%) improved moisture retention and facilitated a more gradual

nutrient release, resulting in greater nitrogen uptake efficiency during critical phases of vegetative and reproductive development.

V. Elevated atmospheric CO_2 significantly improved the physiological performance of blueberry, including water and nutrient use efficiency. However, the substrate played a decisive role in mineral uptake, with coconut fiber (70%) and peat (30%) and coconut fiber (90%) and perlite (10%) proving more effective in enhancing nutrient availability.

VI. Atmospheric enrichment to 1000 ppm CO_2 represents an effective agronomic strategy for improving photosynthetic rate and productivity in blueberry. Nonetheless, prolonged exposure must be accompanied by balanced water and nutrient supply, as it could induce acclimation mechanisms that negatively affect metabolic efficiency and fruit quality.

VII. Aquaporins, essential for regulating water and solute transport across cell membranes, show differential expression depending on the substrate used in cannabis cultivation. In this context, PIP1.4 (an aquaporin responsive to water stress) was more highly expressed in substrates with low AW values, such as coconut fiber (70%) and perlite (30%), coconut fiber (100%), and coconut fiber (90%) and perlite (10%). On the other hand, aquaporin PIP2.3 was more highly expressed in coconut fiber (90%) and perlite (10%) and coconut fiber (60%), peat (30%), and perlite (10%), enhancing water supply to the plants, which coincided with increased growth; however, no direct correlation with substrate characteristics was observed.

VIII. Substrate conditions significantly affected the composition of secondary metabolites only in cannabis. Specific combinations such as coconut fiber (60%), peat (30%) and perlite (10%) and coconut fiber (100%) promoted CBD accumulation in cannabis, indicating that the physico-chemical characteristics of the substrate modulate

biosynthetic pathways in a specific manner, such as low porosity in coconut fiber (60%), peat (30%), and perlite (10%) and low AW in coconut fiber (100%).

IX. Finally, since soilless cultivation is presented as a viable technological alternative for the efficient and sustainable production of agricultural species, the specific substrate composition must be selected according to each species, environmental conditions, and final cultivation requirements.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abad, M., Fornes, F., Carrión, C., Noguera, V., Noguera, P., Maquieira, Á., & Puchades, R. (2005). Physical properties of various coconut coir dusts compared to peat. *HortScience*, *40*(7), 2138–2144. https://doi.org/10.21273/hortsci.40.7.2138

Abad M., M. H. , & Martínez J. (1993). *EVALUACION AGRONOMICA DE LOS SUSTRATOS DE CULTIVO*.

Abad, M., Noguera, P., & Burés, S. (2001). National inventory of organic wastes for use as growing media for ornamental potted plant production: Case study in Spain. *Bioresource Technology*, *77*(2), 197–200. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00152-8

Abad, M., Noguera, P., Puchades, R., Maquieira, A., & Noguera, V. (2002). Physico-chemical and chemical properties of some coconut coir dusts for use as a peat substitute for containerised ornamental plants. *Bioresource Technology*, *82*(3), 241–245. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00189-4

Adavi, S. B., & Sathee, L. (2021). Elevated CO2 alters tissue balance of nitrogen metabolism and downregulates nitrogen assimilation and signalling gene expression in wheat seedlings receiving high nitrate supply. *Protoplasma*, *258*(1), 219–233. https://doi.org/10.1007/s00709-020-01564-3

Addo, P. W., Desaulniers Brousseau, V., Morello, V., MacPherson, S., Paris, M., & Lefsrud, M. (2021). Cannabis chemistry, post-harvest processing methods and secondary metabolite profiling: A review. In *Industrial Crops and Products* (Vol. 170). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113743

Albuja, V., Andrade, J., Lucano, C., & Rodriguez, M. (2021). Comparativa de las ventajas de los sistemas hidropónicos como alternativas agrícolas en zonas urbanas. *Minerva*, *2*(4), 45–54. https://doi.org/10.47460/minerva.v2i4.26

Amaducci, S., Scordia, D., Liu, F. H., Zhang, Q., Guo, H., Testa, G., & Cosentino, S. L. (2015). Key cultivation techniques for hemp in Europe and China. *Industrial Crops and Products*, *68*, 2–16. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.041

Anderson, S. L., Pearson, B., Kjelgren, R., & Brym, Z. (2021). Response of essential oil hemp (Cannabis sativa L.) growth, biomass, and cannabinoid profiles to varying fertigation rates. *PLoS ONE*, *16*(7 July), 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252985

Ángeles López, G. E., Brindis, F., Cristians Niizawa, S., Ventura Martínez, R., Guadalupe, D., & Ángeles López, E. (2014). Cannabis sativa L., a singular plant. In *Rev Mex Cienc Farm* (Vol. 45, Issue 4). https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952014000400004

Arablousabet, Y., & Povilaitis, A. (2024). Assessing the Role of Air Nanobubble-Saturated Water in Enhancing Soil Moisture, Nutrient Retention, and Plant Growth. *Sustainability (Switzerland)* , *16*(13). https://doi.org/10.3390/su16135727

Aroca, R., Porcel, R., & Ruiz-Lozano, J. M. (2007). How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in

Phaseolus vulgaris under drought, cold or salinity stresses? *New Phytologist*, *173*(4), 808–816. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01961.x

Atzori, G., Pane, C., Zaccardelli, M., Cacini, S., & Massa, D. (2021). The Role of Peat-Free Organic Substrates in the Sustainable Management of Soilless Cultivations. *Agronomy*, *11*(6), 1236. https://doi.org/10.3390/agronomy11061236

Baenas, N., Ferreres, F., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2015). Radish sprouts-Characterization and elicitation of novel varieties rich in anthocyanins. *Food Research International*, *69*, 305–312. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.009

Bahadur, B., Manchikatla, ·, Rajam, V., Sahijram, L., & Krishnamurthy, · K V. (2015). *Plant Biology and Biotechnology*. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6

Baixauli, C., & Aguilar, J. (2002). Cultivo sin suelo de hortalizas: aspectos prácticos y experiencias. In *Valencia (España), Generalitat Valenciana*.

Bañados, M. P. (2009). Expanding blueberry production into non-traditional production areas: Northern Chile and Argentina, Mexico and Spain. *Acta Horticulturae*, *810*, 439–444. https://doi.org/10.17660/actahortic.2009.810.57

Barrow, N. J., & Hartemink, A. E. (2023). The effects of pH on nutrient availability depend on both soils and plants. *Plant and Soil*, *0123456789*. https://doi.org/10.1007/s11104-023-05960-5

Bar-Tal, A., Aloni, B., Karni, L., & Rosenberg, R. (2001). Nitrogen Nutrition of Greenhouse Pepper. II. Effects of Nitrogen Concentration and NO 3 : NH 4 Ratio on Growth, Transpiration, and Nutrient Uptake effects of N concentration and N-NO 3 : N-NH 4 ratio in the nutrient solution on growth, transpiration, and . *Hortscience*, *36*(7), 1252–1259. http://hortsci.ashspublications.org/content/36/7/1252.short

Barzana, G., Rios, J. J., Lopez-Zaplana, A., Nicolas-Espinosa, J., Yepes-Molina, L., Garcia-Ibañez, P., & Carvajal, M. (2021). Interrelations of nutrient and water transporters in plants under abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, *171*(4), 595–619. https://doi.org/10.1111/ppl.13206

Becerra, C., Defilippi, B., France, A., González, A., Hirzel, J., Morales, C. G., Pedreros, A., Riquelme, J., Robledo, P., & Uribe, H. (2017). Manual de manejo agronómico del arándano. *Boletín INIA*, 98. https://www.indap.gob.cl/docs/default-source/default-document-library/manual-arandanos.pdf?sfvrsn=0

Becker, A. L., Crowl, A. A., Luteyn, J. L., Chanderbali, A. S., Judd, W. S., Manos, P. S., Soltis, D. E., Smith, S. A., Goncalves, D. J. P., Dick, C. W., Weaver, W. N., Soltis, P. S., Cellinese, N., & Fritsch, P. W. (2024). A global blueberry phylogeny: Evolution, diversification, and biogeography of Vaccinieae (Ericaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *201*. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2024.108202

Bishop, K. A., Leakey, A. D. B., & Ainsworth, E. A. (2014). How seasonal temperature or water inputs affect the relative response of C3 crops to elevated [CO2]: A global analysis of open top chamber and free air CO2 enrichment studies. *Food and Energy Security*, *3*(1), 33–45. https://doi.org/10.1002/fes3.44

Bonanomi, G., De Filippis, F., Zotti, M., Idbella, M., Cesarano, G., Al-Rowaily, S., & Abd-ElGawad, A. (2020). Repeated applications of organic amendments promote beneficial microbiota, improve soil fertility and increase crop yield. *Applied Soil*

Ecology, *156*, 103714. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103714

Boyaji, S., Merkow, J., Elman, R. N. M., Kaye, A. D., Yong, R. J., & Urman, R. D. (2020). The Role of Cannabidiol (CBD) in Chronic Pain Management: An Assessment of Current Evidence. In *Current Pain and Headache Reports* (Vol. 24, Issue 2). Springer. https://doi.org/10.1007/s11916-020-0835-4

Bryla, D. R., & Strik, B. C. (2015). Nutrient requirements, leaf tissue standards, and new options for fertigation of northern highbush blueberry. *HortTechnology*, *25*(4), 464–470. https://doi.org/10.21273/horttech.25.4.464

Burgel, L., Hartung, J., & Graeff-Hönninger, S. (2020). Impact of different growing substrates on growth, yield and cannabinoid content of two cannabis sativa L. Genotypes in a pot culture. *Horticulturae*, *6*(4), 1–14. https://doi.org/10.3390/horticulturae6040062

Burgel, L., Hartung, J., & Schibano, D. (2020). Yield and Cannabinoid Content of Cannabis sativa L . *Plants*, *9*(March 2017), 1–16.

Burnett, S. E., Mattson, N. S., & Williams, K. A. (2016). Substrates and fertilizers for organic container production of herbs, vegetables, and herbaceous ornamental plants grown in greenhouses in the United States. *Scientia Horticulturae*, *208*, 111–119. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.01.001

Cabrera, R. I. (1999). Propiedades , Uso Y Manejo De Sustratos De Cultv ck alac

Dong, J., Gruda, N., Lam, S. K., Li, X., & Duan, Z. (2018). Effects of elevated CO2 on nutritional quality of vegetables: A review. *Frontiers in Plant Science*, *9*(August), 1–11. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00924

Doyle, J. W., Nambeesan, S. U., & Malladi, A. (2021). Physiology of Nitrogen and Calcium Nutrition in Blueberry (Vaccinium sp.). *Agronomy*, *11*(4), 765. https://doi.org/10.3390/agronomy11040765

Du, C., Wang, X., Zhang, M., Jing, J., & Gao, Y. (2019). Effects of elevated CO2 on plant C-N-P stoichiometry in terrestrial ecosystems: A meta-analysis. *Science of The Total Environment*, *650*, 697–708. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.051

Eisa, E. A., Pasquel Davila, D. S., & Ördögh, M. (2025). Enhancing Acclimatization Conditions for Vriesea splendens 'Fire': A Comparative Analysis of Substrate Effects on Growth and Survival. *Plants*, *14*(2). https://doi.org/10.3390/plants14020172

Elbasiouny, H., El-Ramady, H., Elbehiry, F., Rajput, V. D., Minkina, T., & Mandzhieva, S. (2022). Plant Nutrition under Climate Change and Soil Carbon Sequestration. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 14, Issue 2). MDPI. https://doi.org/10.3390/su14020914

Fang, Y., Nunez, G., Fisher, P., & Munoz, P. R. (2022). Effect of container size, substrate composition, and genotype on growth and fruit quality of young southern highbush blueberry in a container-based intensive production system. *Scientia Horticulturae*, *302*(March), 111149. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111149

Fang, Y., Nunez, G. H., da Silva, M. N., Phillips, D. A., & Munoz, P. R. (2020). A review for southern highbush blueberry alternative production systems. In *Agronomy* (Vol. 10, Issue 10). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/AGRONOMY10101531

Ferreira Barreto, R., Rodrigues Cruz, F. J., Aparecido Gaion, L., de Mello Prado, R., & Falleiros Carvalho, R. (2018). Accompanying ions of ammonium sources and nitrate : ammonium ratios in tomato plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *181*(3), 382–387. https://doi.org/10.1002/jpln.201700413

Fu, Y., Zhong, X., Lu, C., Liang, K., Pan, J., Hu, X., Hu, R., Li, M., Ye, Q., & Liu, Y. (2023). Growth, nutrient uptake and transcriptome profiling of rice seedlings in response to mixed provision of ammonium- and nitrate-nitrogen. *Journal of Plant Physiology*, *284*. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2023.153976

Fussy, A., & Papenbrock, J. (2022). An Overview of Soil and Soilless Cultivation Techniques—Chances, Challenges and the Neglected Question of Sustainability. *Plants*, *11*(9). https://doi.org/10.3390/plants11091153

Gabarin, A., Yarmolinsky, L., Budovsky, A., Khalfin, B., & Ben-Shabat, S. (2023). Cannabis as a Source of Approved Drugs: A New Look at an Old Problem. In *Molecules* (Vol. 28, Issue 23). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/molecules28237686

Garcia-Ibañez, P., Sanchez-Garcia, M., Sánchez-Monedero, M. A., Cayuela, M. L., & Moreno, D. A. (2020). Olive tree pruning derived biochar increases glucosinolate concentrations in broccoli. *Scientia Horticulturae*, *267*(September 2019), 109329. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109329

Gojon, A., Cassan, O., Bach, L., Lejay, L., & Martin, A. (2023). The decline of plant mineral nutrition under rising CO2: physiological and molecular aspects of a bad

deal. *Trends in Plant Science*, *28*(2), 185–198. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.09.002

Gómez-Bellot, M. J., Lorente, B., Sánchez-Blanco, M. J., Ortuño, M. F., Nortes, P. A., & Alarcón, J. J. (2020). Influence of mixed substrate and arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthetic efficiency, nutrient and water status and yield in tomato plants irrigated with saline reclaimed waters. *Water (Switzerland)*, *12*(2), 1–15. https://doi.org/10.3390/w12020438

Han, L., Mo, M., Gao, Y., Ma, H., Xiang, D., Ma, G., & Mao, H. (2022). Effects of New Compounds into Substrates on Seedling Qualities for Efficient Transplanting. *Agronomy*, *12*(5), 6–8. https://doi.org/10.3390/agronomy12050983

Hancock, J., & Retamales, J. (2012a). Blueberry field management and harvesting. In *Blueberries* (pp. 143–192). CABI. https://doi.org/10.1079/9781845939045.0143

Hancock, J., & Retamales, J. (2012b). Blueberry taxonomy and breeding. In *Blueberries* (pp. 19–49). CABI. https://doi.org/10.1079/9781845939045.0019

Hartmann, R., & De Boodt, M. (1974). The influence of the moisture content, texture and organic matter on the aggregation of sandy and loamy soils. In *Geoderma* (Vol. 11).

Hawkesford, M., Horst, W., Kichey, T., Lambers, H., Schjoerring, J., Møller, I. S., & White, P. (2011). Functions of Macronutrients. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition*. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00006-6

Heimler, D., Romani, A., & Ieri, F. (2017). Plant polyphenol content, soil fertilization and agricultural management: a review. *European Food Research and Technology*, *243*(7), 1107–1115. https://doi.org/10.1007/s00217-016-2826-6

Heller, C. R., & Nunez, G. H. (2022). Preplant Fertilization Increases Substrate Microbial Respiration But Does Not Affect Southern Highbush Blueberry Establishment in a Coconut Coir-based Substrate. *HortScience*, *57*(1), 17–21. https://doi.org/10.21273/HORTSCI16220-21

Hodgson, E. (2012). Toxins and venoms. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 112, pp. 373–415). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415813-9.00014-3

Hong, H. J., Sloan, L., Saxena, D., & Scott, D. A. (2022). The Antimicrobial Properties of Cannabis and Cannabis-Derived Compounds and Relevance to CB2-Targeted Neurodegenerative Therapeutics. In *Biomedicines* (Vol. 10, Issue 8). MDPI. https://doi.org/10.3390/biomedicines10081959

Hosseinzadeh, S., Verheust, Y., Bonarrigo, G., & Van Hulle, S. (2017). Closed hydroponic systems: operational parameters, root exudates occurrence and related water treatment. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, *16*(1), 59–79. https://doi.org/10.1007/s11157-016-9418-6

Hourfane, S., Mechqoq, H., Bekkali, A. Y., Rocha, J. M., & El Aouad, N. (2023). A Comprehensive Review on Cannabis sativa Ethnobotany, Phytochemistry, Molecular Docking and Biological Activities. In *Plants* (Vol. 12, Issue 6). MDPI. https://doi.org/10.3390/plants12061245

Jacotot, A., Marchand, C., Gensous, S., & Allenbach, M. (2018). Effects of elevated atmospheric CO2 and increased tidal flooding on leaf gas-exchange parameters of two common mangrove species: Avicennia marina and Rhizophora stylosa.

Photosynthesis Research, *138*(2), 249–260. https://doi.org/10.1007/s11120-018-0570-4

Jahromi, N. B., Fulcher, A., Walker, F., & Altland, J. (2020). Optimizing substrate available water and coir amendment rate in pine bark substrates. *Water (Switzerland)*, *12*(2). https://doi.org/10.3390/w12020362

Jasik, M., Kormanek, M., Staszel-Szlachta, K., & Małek, S. (2023). Leachate Tables as a Tool for Monitoring Changes in Physical and Chemical Parameters of the Peat Substrate in the Cells of Nursery Containers. *Forests*, *14*(12). https://doi.org/10.3390/f14122398

Jennings, A., MacGregor, A., Spector, T., & Cassidy, A. (2017). Higher dietary flavonoid intakes are associated with lower objectively measured body composition in women: Evidence from discordant monozygotic twins. *American Journal of Clinical Nutrition*. https://doi.org/10.3945/ajcn.116.144394

Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes. (2023). *Informe de la Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes correspondiente a 2023*. www.incb.org

Kannan, M., Elavarasan, G., Balamurugan, A., Dhanusiya, B., & Freedon, D. (2022). Hydroponic farming – A state of art for the future agriculture. *Materials Today: Proceedings*, *68*, 2163–2166. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.08.416

Khalifa, I., Du, J., Nawaz, A., & Li, C. (2021). Multiple co-pigments of quercetin and chlorogenic acid blends intensify the color of mulberry anthocyanins: insights from hyperchromicity, kinetics, and molecular modeling investigations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *101*, 1579–1588. https://doi.org/10.1002/jsfa.10777

Kim, S. A., & Guerinot, M. Lou. (2007). Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Letters*, *581*(12), 2273–2280. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.043

Kim, S. J., Yu, D. J., Kim, T. C., & Lee, H. J. (2011). Growth and photosynthetic characteristics of blueberry (Vaccinium corymbosum cv. Bluecrop) under various shade levels. *Scientia Horticulturae*, *129*(3), 486–492. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.04.022

Kingston, P. H., Scagel, C. F., Bryla, D. R., & Strik, B. (2017). Suitability of Sphagnum Moss, Coir, and Douglas Fir Bark as Soilless Substrates for Container Production of Highbush Blueberry. *HortScience*, *52*(12), 1692–1699. https://doi.org/10.21273/HORTSCI12374-17

Kingston, P. H., Scagel, C. F., Bryla, D. R., & Strik, B. C. (2020). Influence of perlite in peat- And coirbased media on vegetative growth and mineral nutrition of highbush blueberry. *HortScience*, *55*(5), 658–663. https://doi.org/10.21273/HORTSCI14640-19

Kirschbaum, M. U. F., & McMillan, A. M. S. (2018). Warming and Elevated CO2 Have Opposing Influences on Transpiration. Which is more Important? In *Current Forestry Reports* (Vol. 4, Issue 2, pp. 51–71). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/s40725-018-0073-8

Kleinwächter, M., & Selmar, D. (2015). New insights explain that drought stress enhances the quality of spice and medicinal plants: potential applications. *Agronomy for Sustainable Development*, *35*(1), 121–131. https://doi.org/10.1007/s13593-014-0260-3

Konduru, S., Evans, M. R., & Stamps, R. H. (1999). Coconut husk and processing effects on chemical and physical properties of coconut coir dust. *HortScience*, *34*(1), 88–90. https://doi.org/10.21273/hortsci.34.1.88

Kostanda, E., & Khatib, S. (2022). Biotic stress caused by Tetranychus urticae mites elevates the quantity of secondary metabolites, cannabinoids and terpenes, in Cannabis sativa L. *Industrial Crops and Products*, *176*(December 2021), 114331. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114331

Kotiranta, S., Pihlava, J. M., Kotilainen, T., & Palonen, P. (2024). The morphology, inflorescence yield, and secondary metabolite accumulation in hemp type Cannabis sativa can be influenced by the R:FR ratio or the amount of short wavelength radiation in a spectrum. *Industrial Crops and Products*, *208*. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117772

Kumar, A., Singh, U. M., Manohar, M., & Gaur, V. S. (2015). Calcium transport from source to sink: understanding the mechanism(s) of acquisition, translocation, and accumulation for crop biofortification. In *Acta Physiologiae Plantarum* (Vol. 37, Issue 1). Polish Academy of Sciences, Institute of Slavic Studies. https://doi.org/10.1007/s11738-014-1722-6

Lee, S. Y., Kim, E. G., Park, J. R., Ryu, Y. H., Moon, W., Park, G. H., Ubaidillah, M., Ryu, S. N., & Kim, K. M. (2021). Effect on chemical and physical properties of soil each peat moss, elemental sulfur, and sulfur-oxidizing bacteria. *Plants*, *10*(9), 1–13. https://doi.org/10.3390/plants10091901

Lemaire, F. (1995). Physical, Chemical and Biological Properties of Growing Medium. In *Acta Horticulturae* (Issue 396, pp. 273–284). https://doi.org/10.17660/actahortic.1995.396.33

Leng, H., Jiang, C., Song, X., Lu, M., & Wan, X. (2021). Poplar aquaporin PIP1;1 promotes Arabidopsis growth and development. *BMC Plant Biology*, *21*(1). https://doi.org/10.1186/s12870-021-03017-2

Li, J., Yu, G., Sun, X., Liu, Y., Liu, J., Zhang, X., Jia, C., & Pan, H. (2015). AcPIP2, a plasma membrane intrinsic protein from halophyte Atriplex canescens, enhances plant growth rate and abiotic stress tolerance when overexpressed in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Reports*, *34*(8), 1401–1415. https://doi.org/10.1007/s00299-015-1796-7

Li, M., Li, M., Li, D., Wang, S. M., & Yin, H. (2021). Overexpression of the zygophyllum xanthoxylum aquaporin, zxpip1;3, promotes plant growth and stress tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(4), 1–15. https://doi.org/10.3390/ijms22042112

Li, X., Zhu, F., & Zeng, Z. (2021). Effects of different extraction methods on antioxidant properties of blueberry anthocyanins. *Open Chemistry*, *19*(1), 138–148. https://doi.org/10.1515/chem-2020-0052

Linger, P., Mü Ssig, J., Fischer, H., & Kobert, J. (2002). Industrial hemp (Cannabis sati6a L.) growing on heavy metal contaminated soil: fibre quality and phytoremediation potential. In *Industrial Crops and Products* (Vol. 16). www.elsevier.com/locate/indcrop

Liu, J., Hu, T., Fang, L., Peng, X., & Liu, F. (2019). CO 2 elevation modulates the response of leaf gas exchange to progressive soil drying in tomato plants. *Agricultural and*

Forest Meteorology, *268*, 181–188. https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2019.01.026

Loarca, J., Liou, M., Dawson, J. C., & Simon, P. W. (2024). Advancing utilization of diverse global carrot (Daucus carota L.) germplasm with flowering habit trait ontology. *Frontiers in Plant Science*, *15*. https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1342513

Lobo, A. K. M., Catarino, I. C. A., Silva, E. A., Centeno, D. C., & Domingues, D. S. (2022). Physiological and Molecular Responses of Woody Plants Exposed to Future Atmospheric CO2 Levels under Abiotic Stresses. In *Plants* (Vol. 11, Issue 14). MDPI. https://doi.org/10.3390/plants11141880

Lopez-Zaplana, A., Nicolas-Espinosa, J., Albaladejo-Marico, L., & Carvajal, M. (2024). Exploring the mechanism of blindness physiopathy in Brassica oleracea var italica L. by comprehensive transcriptomics and metabolomics analysis. *Plant Physiology and Biochemistry*, *206*. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108304

Machado, R. M. A., Alves-Pereira, I., Ferreira, R., & Gruda, N. S. (2021). Coir, an alternative to peat—effects on plant growth, phytochemical accumulation, and antioxidant power of spinach. *Horticulturae*, *7*(6). https://doi.org/10.3390/horticulturae7060127

Madeira, A., Moura, T. F., & Soveral, G. (2016). Detecting aquaporin function and regulation. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 4, Issue FEB). Frontiers Media S. A. https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00003

Magagnini, G., Grassi, G., & Kotiranta, S. (2018). The Effect of Light Spectrum on the Morphology and Cannabinoid Content of Cannabis sativa L. *Medical Cannabis and Cannabinoids*, *1*(1), 19–27. https://doi.org/10.1159/000489030

Manzanero, B. R., Kulkarni, K. P., Vorsa, N., Reddy, U. K., Natarajan, P., Elavarthi, S., Iorizzo, M., & Melmaiee, K. (2023). Genomic and evolutionary relationships among wild and cultivated blueberry species. *BMC Plant Biology*, *23*(1). https://doi.org/10.1186/s12870-023-04124-y

Marschner, P. (2012). Marschner ' s Mineral Nutrition of Higher Plants . Edition No . 3. In *Marschner ' s Mineral Nutrition of Higher Plants* (Issue 3).

Martău, G. A., Bernadette-Emőke, T., Odocheanu, R., Soporan, D. A., Bochiș, M., Simon, E., & Vodnar, D. C. (2023). Vaccinium Species (Ericaceae): Phytochemistry and Biological Properties of Medicinal Plants. In *Molecules* (Vol. 28, Issue 4). MDPI. https://doi.org/10.3390/molecules28041533

Masclef. (1891). *PLANTES DE FRANCE*. https://bibdigital.rjb.csic.es/medias/08/05/cf/30/0805cf30-6eb8-40c2-9cc9-03316aef0e11/files/MAS_Atl_Pl_France_1.pdf

Mengel, K., & Kirkby, E. (2000). Principios de Nutrición Vegetal. *Instituto Internacional de La Potasa*, *1*, 11–23. https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/66737/mod_resource/content/2/PRINCIPIOS DE NUTRICIÓN VEGETAL.pdf

Moher, M., Llewellyn, D., Jones, M., & Zheng, Y. (2022). Light intensity can be used to modify the growth and morphological characteristics of cannabis during the vegetative stage of indoor production. *Industrial Crops and Products*, *183*. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114909

Naeem, M., Ansari, A. A., & Gill, S. S. (2020). Contaminants in agriculture: Sources, impacts and management. In *Contaminants in Agriculture: Sources, Impacts and Management*. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41552-5

Nemati, R.; Fortin J.-P.; Craig J.; Donald, S. (2021). Growing Mediums for Medical Cannabis Production in North America. *Agronomy*, 1–12. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/agronomy11071366

Nunes, L. J. R. (2023). The Rising Threat of Atmospheric CO2: A Review on the Causes, Impacts, and Mitigation Strategies. In *Environments - MDPI* (Vol. 10, Issue 4). MDPI. https://doi.org/10.3390/environments10040066

Ortiz-Delvasto, N., & Carvajal, M. (2025). Elevated carbon dioxide and substrate composition affect growth, nutrient uptake, and water use efficiency in blueberry cultivation under greenhouse. *Journal of Plant Nutrition*. https://doi.org/10.1080/01904167.2025.2470388

Ortiz-Delvasto, N., Garcia-Gomez, P., Carvajal, M., & Bárzana, G. (2023). Aquaporins-mediated water availability in substrates for cannabis cultivation in relation to CBD yield. *Plant and Soil*, *0123456789*. https://doi.org/10.1007/s11104-023-06341-8

Ortiz-Delvasto, N., Garcia-Ibañez, P., Olmos-Ruiz, R., Bárzana, G., & Carvajal, M. (2023). Substrate composition affects growth and physiological parameters of blueberry. *Scientia Horticulturae*, *308*(3). https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111528

Pabst, G., & Vogtherr, Max. (1885). *Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte; Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica, suecica, neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur Pharmacopoeia of the United States of America*. Köhler.

Pan, T., Ding, J., Qin, G., Wang, Y., Xi, L., Yang, J., Li, J., Zhang, J., & Zou, Z. (2019). Interaction of supplementary light and CO2 enrichment improves growth, photosynthesis, yield, and quality of tomato in autumn through spring greenhouse production. *HortScience*, *54*(2), 246–252. https://doi.org/10.21273/HORTSCI13709-18

Pandey, R. (2015). Mineral Nutrition of Plants. In B. Bahadur, M. Venkat Rajam, L. Sahijram, & K. V Krishnamurthy (Eds.), *Plant Biology and Biotechnology: Volume I: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement* (pp. 499–538). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6_20

Papadopoulos, A. P., Bar-Tal, A., Silber, A., Saha, U. K., & Raviv, M. (2008). Inorganic and synthetic organic components of soilless culture and potting mixes. In *Soilless Culture: Theory and Practice* (Issue April 2019). https://doi.org/10.1016/B978-044452975-6.50014-9

Park, S.-H., Pauli, C. S., Gostin, E. L., Staples, S. K., Seifried, D., Kinney, C., & Vanden Heuvel, B. D. (2022). Effects of short-term environmental stresses on the onset of cannabinoid production in young immature flowers of industrial hemp (Cannabis sativa L.). *Journal of Cannabis Research*, *4*(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/s42238-021-00111-y

Pathak, R. K., Singh, D. B., Sharma, H., Pandey, D., & Dwivedi, S. (2021). Calcium uptake and translocation in plants. In *Calcium Transport Elements in Plants*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821792-4.00018-7

Pérez-Bermúdez, P., & Rognoni Martínez, A. (2022). Strategies to improve Cannabis cultivation: optimizing plant growth and phytocannabinoid biosynthesis. In *Current Applications, Approaches and Potential Perspectives for Hemp: Crop Management, Industrial Usages, and Functional Purposes* (pp. 77–108). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89867-6.00008-1

Pervaiz, T., Songtao, J., Faghihi, F., Haider, M. S., & Fang, J. (2017). Naturally occurring anthocyanin, structure, functions and biosynthetic pathway in fruit plants. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, *05*(02). https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000187

Poonnachit, U., & Darnell, R. (2004). Effect of ammonium and nitrate on ferric chelate reductase and nitrate reductase in Vaccinium species. *Annals of Botany*, *93*(4), 399–405. https://doi.org/10.1093/aob/mch053

Prasad, M., Chrysargyris, A., McDaniel, N., Kavanagh, A., Gruda, N. S., & Tzortzakis, N. (2020). Plant nutrient availability and pH of biochars and their fractions, with the possible use as a component in a growing media. *Agronomy*, *10*(1). https://doi.org/10.3390/agronomy10010010

Purcell, C., Batke, S. P., Yiotis, C., Caballero, R., Soh, W. K., Murray, M., & McElwain, J. C. (2018). Increasing stomatal conductance in response to rising atmospheric CO2. *Annals of Botany*, *121*(6), 1137–1149. https://doi.org/10.1093/aob/mcx208

Purvis, A. C., Peters, D. B., & Hageman, R. H. (1974). Effect of Carbon Dioxide on Nitrate Accumulation and Nitrate Reductase Induction in Corn Seedlings. *Plant Physiology*, *53*(6), 934–941. https://doi.org/10.1104/pp.53.6.934

Ramirez-Villacis, D. X., Pinos-Leon, A., Vega-Polo, P., Salas-González, I., Jones, C. D., & Torres, M. de L. (2023). Untangling the Effects of Plant Genotype and Soil Conditions on the Assembly of Bacterial and Fungal Communities in the Rhizosphere of the Wild Andean Blueberry (Vaccinium floribundum Kunth). *Microorganisms*, *11*(2). https://doi.org/10.3390/microorganisms11020399

Raviv, M. & Lieth, J. H. (2008). *Soilless culture: Theory and practice.* (Vol. 5, Issue 3).

Raviv, M., Box, P. O., Yishay, R., & Wallach, R. (1999). *[23279788 - Journal of the American Society for Horticultural Science] The Effect of Hydraulic Characteristics of Volcanic Materials on Yield of Roses Grown in Soill*. *124*(2), 205–209.

Raviv, M., Wallach, R., & Blom, T. J. (2004). The effect of physical properties of soilless media on plant performance - A review. *Acta Horticulturae*, *644*(February 2020), 251–259. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.644.34

Reshi, Z. A., Ahmad, W., Lukatkin, A. S., & Javed, S. Bin. (2023). From Nature to Lab: A Review of Secondary Metabolite Biosynthetic Pathways, Environmental Influences, and In Vitro Approaches. In *Metabolites* (Vol. 13, Issue 8). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/metabo13080895

Rizzo, G., Storz, M. A., & Calapai, G. (2023). The Role of Hemp (Cannabis sativa L.) as a Functional Food in Vegetarian Nutrition. In *Foods* (Vol. 12, Issue 18). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/foods12183505

Sade, N., Shatil-Cohen, A., & Moshelion, M. (2015). Bundle-sheath aquaporins play a role in controlling Arabidopsis leaf hydraulic conductivity. *Plant Signaling and Behavior*, *10*(5), 1–4. https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1017177

Saloner, A., & Bernstein, N. (2022). Nitrogen Source Matters: High NH4/NO3 Ratio Reduces Cannabinoids, Terpenoids, and Yield in Medical Cannabis. *Frontiers in Plant Science*, *13*. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.830224

Sambo, P., Nicoletto, C., Giro, A., Pii, Y., Valentinuzzi, F., Mimmo, T., Lugli, P., Orzes, G., Mazzetto, F., Astolfi, S., Terzano, R., & Cesco, S. (2019). Hydroponic Solutions for Soilless Production Systems: Issues and Opportunities in a Smart Agriculture Perspective. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00923

Scagel, C. F. (2003). Growth and nutrient use of ericaceous plants grown in media amended with sphagnum moss peat or coir dust. *HortScience*, *38*(1), 46–54. https://doi.org/10.21273/hortsci.38.1.46

Scharwies, J. D., & Dinneny, J. R. (2019). Water transport, perception, and response in plants. *Journal of Plant Research*, *132*(3), 311–324. https://doi.org/10.1007/s10265-019-01089-8

Schober, T., Präger, A., Hartung, J., Hensmann, F., & Graeff-Hönninger, S. (2023). Growth dynamics and yield formation of Cannabis (Cannabis sativa) cultivated in differing growing media under semi-controlled greenhouse conditions. *Industrial Crops and Products*, *203*. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117172

Schreiber, M. J., & Nunez, G. H. (2021). Calcium carbonate can be used to manage soilless substrate Ph for blueberry production. *Horticulturae*, *7*(4), 0–8. https://doi.org/10.3390/horticulturae7040074

Sial, T. A., Shaheen, S. M., Lan, Z., Korai, P. K., Ghani, M. I., Khan, M. N., Syed, A.-A., Hussain Asghar Ali, M. N., Rajpar, I., Memon, M., Bhatti, S. M., Abdelrahman, H., Ali, E. F., Rinklebe, J., & Zhang, J. (2022). Addition of walnut shells biochar to alkaline arable soil caused contradictory effects on CO2 and N2O emissions, nutrients availability, and enzymes activity. *Chemosphere*, *293*, 133476. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133476

Smith, J. T., Jackson, B. E., Whipker, B. E., & Fonteno, W. C. (2021). Industrial hemp vegetative growth affected by substrate composition. *Acta Horticulturae*, *1305*(1305), 83–90. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1305.12

Smrke, T., Veberic, R., Hudina, M., Stamic, D., & Jakopic, J. (2021). Comparison of highbush blueberry (Vaccinium corymbosum l.) under ridge and pot production. *Agriculture (Switzerland)*, *11*(10). https://doi.org/10.3390/agriculture11100929

Son, J. E., Kim, H. J., & Ahn, T. I. (2019). Hydroponic systems. In *Plant Factory: An Indoor Vertical Farming System for Efficient Quality Food Production: Second Edition*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816691-8.00020-0

Soong, J. L., Janssens, I. A., Grau, O., Margalef, O., Stahl, C., Van Langenhove, L., Urbina, I., Chave, J., Dourdain, A., Ferry, B., Freycon, V., Herault, B., Sardans, J., Peñuelas, J., & Verbruggen, E. (2020). Soil properties explain tree growth and mortality, but not biomass, across phosphorus-depleted tropical forests. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-020-58913-8

Soorni, A., Karimi, M., Al Sharif, B., & Habibi, K. (2023). Genome-wide screening and characterization of long noncoding RNAs involved in flowering/bolting of Lactuca sativa. *BMC Plant Biology*, *23*(1). https://doi.org/10.1186/s12870-022-04031-8

Steudle, E. (2000). Water uptake by plant roots: an integration of views. In *Plant and Soil* (Vol. 226).

Steudle, E., & Peterson, C. A. (1998). How does water get through roots? *Journal of Experimental Botany*, *49*(322), 775–788. https://doi.org/10.1093/jxb/49.322.775

Stevens, P. F., Luteyn, J., Oliver, E. G. H., Bell, T. L., Brown, E. A., Crowden, R. K., George, A. S., Jordan, G. J., Ladd, P., Lemson, K., Mclean, C. B., Menadue, Y., Pate, J. S., Stace, H. M., & Weiller, C. M. (2004). Ericaceae. In K. Kubitzki (Ed.), *Flowering Plants · Dicotyledons: Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales* (pp. 145–194). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-07257-8_19

Stewart-Wade, S. M. (2020). Efficacy of organic amendments used in containerized plant production: Part 1 – Compost-based amendments. *Scientia Horticulturae*, *266*(October 2019), 108856. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108856

Taha, T., Meiri, D., Talhamy, S., Wollner, M., Peer, A., & Bar-Sela, G. (2019). Cannabis Impacts Tumor Response Rate to Nivolumab in Patients with Advanced Malignancies. *The Oncologist*, *24*(4), 549–554. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2018-0383

Tamir, G., Afik, G., Zilkah, S., Dai, N., & Bar-Tal, A. (2021). The use of increasing proportions of N-NH4+ among the total applied inorganic N to improve acidification and the nutritional status and performance of blueberry plants in soilless culture. *Scientia Horticulturae*, *276*(August 2019), 109754. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109754

Tang, X., Li, Y., Fang, M., Li, W., Hong, Y., & Li, Y. (2024). Effects of Different Water Storage and Fertilizer Retention Substrates on Growth, Yield and Quality of Strawberry. *Agronomy*, *14*(1). https://doi.org/10.3390/agronomy14010205

Terés, V. (2001). *Relaciones aire-agua en sustratos de cultivo como base para el control del riego. Metodología de laboratorio y modelización.* 531.

van der Kooi, C. J., Reich, M., Löw, M., De Kok, L. J., & Tausz, M. (2016). Growth and yield stimulation under elevated CO2and drought: A meta-analysis on crops. In *Environmental and Experimental Botany* (Vol. 122, pp. 150–157). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.10.004

Verdoucq, L., & Maurel, C. (2018). Plant Aquaporins. In *Advances in Botanical Research* (1st ed., Vol. 87, pp. 25–56). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/bs.abr.2018.09.011

Vinícius, C., Barreto[1], G., & Testezlaf[2], R. (2014). *Particle size distribution effects on physical characteristics of coconut and pine bark substrates*. *13*(3), 327–336.

Walker, J. M. (2013). *Roles and Functions of Plant Mineral Nutrients*. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-152-3

Wang, A., Lv, J., Wang, J., & Shi, K. (2022). CO2 enrichment in greenhouse production: Towards a sustainable approach. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1029901

Wang, M., Wang, Y. H., Avula, B., Radwan, M. M., Wanas, A. S., Van Antwerp, J., Parcher, J. F., Elsohly, M. A., & Khan, I. A. (2016). Decarboxylation Study of Acidic Cannabinoids: A Novel Approach Using Ultra-High-Performance Supercritical Fluid Chromatography/Photodiode Array-Mass Spectrometry. *Cannabis and Cannabinoid Research*, *1*(1), 262–271. https://doi.org/10.1089/can.2016.0020

Xing, J., Gruda, N., Xiong, J., & Liu, W. (2019). Influence of organic substrates on nutrient accumulation and proteome changes in tomato-roots. *Scientia Horticulturae*, *252*(April), 192–200. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.054

Yang, J. L., & Lin, S. Y. (2025). Evaluating sustainable media mixes using local agricultural and forestry wastes for enhancing the early establishment of container-grown southern highbush blueberry in subtropical climates. *Scientia Horticulturae*, *339*. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.113845

Yang, W., Guo, Y., Liu, M., Chen, X., Xiao, X., Wang, S., Gong, P., Ma, Y., & Chen, F. (2022). Structure and function of blueberry anthocyanins: A review of recent advances. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 88). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104864

Yang, X., Li, J., Ji, C., Wei, Z., Zhao, T., & Pang, Q. (2022). Overexpression of an aquaporin gene EsPIP1;4 enhances abiotic stress tolerance and promotes flowering in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology and Biochemistry*, *193*(September), 25–35. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.10.019

Yang, X., Ramos-Meza, C. S., Shabbir, M. S., Ali, S. A., & Jain, V. (2022). The impact of renewable energy consumption, trade openness, CO2 emissions, income inequality, on economic growth. In *Energy Strategy Reviews* (Vol. 44). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.esr.2022.101003

Yelle, S., Gosselin, A., & Trudel, M.-J. (1987). Effect of Atmospheric CO2 Concentration and Root-zone Temperature on Growth, Mineral Nutrition, and Nitrate Reductase Activity of Greenhouse Tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *112*(6), 1036–1040. https://doi.org/10.21273/jashs.112.6.1036

Yepes-Molina, L., Bárzana, G., & Carvajal, M. (2020). Controversial regulation of gene expression and protein transduction of aquaporins under drought and salinity stress. *Plants*, *9*(12), 1–18. https://doi.org/10.3390/plants9121662

Yu, Y. Y., Xu, J. Da, Huang, T. X., Zhong, J., Yu, H., Qiu, J. P., & Guo, J. H. (2020). Combination of beneficial bacteria improves blueberry production and soil quality. *Food Science and Nutrition*. https://doi.org/10.1002/fsn3.1772

Zhang, J., Lv, J., Dawuda, M. M., Xie, J., Yu, J., Li, J., Zhang, X., Tang, C., Wang, C., & Gan, Y. (2019). Appropriate Ammonium-Nitrate Ratio Improves Nutrient Accumulation and Fruit Quality in Pepper (Capsicum annuum L.). *Agronomy*, *9*(11). https://doi.org/10.3390/agronomy9110683

Zhang, J., Wen, W., Li, H., Lu, Q., Xu, B., & Huang, B. (2020). Overexpression of an aquaporin gene PvPIP2;9 improved biomass yield, protein content, drought tolerance and water use efficiency in switchgrass (Panicum virgatum L.). *GCB Bioenergy*, *12*(11), 979–991. https://doi.org/10.1111/gcbb.12751

Zheng, Z. L. (2009). Carbon and nitrogen nutrient balance signaling in plants. In *Plant Signaling and Behavior* (Vol. 4, Issue 7, pp. 584–591). https://doi.org/10.4161/psb.4.7.8540

Zhu, Y., Qi, B., Hao, Y., Liu, H., Sun, G., Chen, R., & Song, S. (2021). Appropriate NH4+/NO3– Ratio Triggers Plant Growth and Nutrient Uptake of Flowering Chinese Cabbage by Optimizing the pH Value of Nutrient Solution. *Frontiers in Plant Science*, *12*. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.656144