



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Cambios en la alocaación de nitrógeno foliar durante la evolución de las plantas

Francesc Mas Artigues

Grado de Biología

Año académico 2013-14

DNI del alumno: 41524602B

Trabajo tutelado por Jeroni Galmés Galmés

Departamento de Biología - Área de Fisiología Vegetal



Se autoriza a la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas i de investigación.

Palabras clave del trabajo:

*Carboxilación, Clorofila, Evolución, Fotosíntesis,
Hoja, Nitrógeno, Proteína, Rubisco*

RESUMEN

El nitrógeno es un nutriente limitante en el desarrollo de las plantas debido a la dificultad que tienen estas de obtenerlo, de manera que lo utilizaran de la manera más eficiente posible. Las proteínas son las macromoléculas de los seres vivos con una concentración más alta de nitrógeno. En las plantas la proteína más abundante y la más importante es la Rubisco, debido a que la fijación de CO₂ catalizada por la Rubisco es un factor limitante de la fotosíntesis. En el presente estudio se compararon las concentraciones de proteínas solubles, Rubisco y clorofilas en hojas de distintas especies de plantas de diferentes grupos filogenéticos de las plantas terrestres. Se observaron valores estadísticamente superiores en los tres parámetros estudiados al comparar plantas con sistema vascular con plantas que carecen de él. Pero, no se observaron valores estadísticamente superiores en los tres parámetros estudiados al comparar plantas que se reproducen con semillas con plantas que no se reproducen por. En conjunto, se observó una tendencia a incrementar la cantidad de proteínas solubles foliares y de Rubisco foliar a lo largo de la evolución de las plantas terrestres, siendo menor en grupos cercanos filogenéticamente a los briófitos, considerados los más cercanos filogenéticamente a las primeras plantas terrestres, y mayor en grupos cercanos filogenéticamente a los angiospermas, siendo estos el grupo de plantas terrestres más abundante y diversificado.

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es uno de los nutrientes limitantes en el crecimiento de las plantas, esto lo convierte en un recurso muy preciado. La mayoría del nitrógeno disponible se encuentra en la atmósfera en forma de gas (N₂). Las plantas han desarrollado muchas estrategias para conseguir asimilar este nutriente. Algunas de estas estrategias son simbiosis con diferentes grupos de bacterias. De estas simbiosis, la más conocida y eficiente es la que se da a la familia de las leguminosas con bacterias de tipo *Rhizobium*, así la planta consigue amonio a cambio de carbohidratos sintetizados en la fotosíntesis. También se dan casos de simbiosis con hongos (micorrizas) que incrementan la superficie de absorción y disponen de mecanismos específicos de captura de algunos iones. En ambientes muy pobres se dan casos como el de las plantas carnívoras que han desarrollado mecanismos muy complicados para captar nitrógeno y otros nutrientes capturando insectos u otros animales pequeños. Estas adaptaciones suponen un elevado coste energético para la planta, demostrando lo necesario que es para la planta obtener este nutriente (Margalef 1999).

Una proteína es una macromolécula orgánica compleja que contiene carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre y por lo general se componen de una o más cadenas de aminoácidos unidas por enlaces peptídicos (Fig. 1). El nitrógeno presente en el grupo amino y en la cadena lateral de los aminoácidos hace que estas sean las biomoléculas con una mayor proporción de nitrógeno, por lo tanto, los organismos invierten la mayoría del nitrógeno que asimilan en sintetizar proteínas (Nelson y Cox 2000).

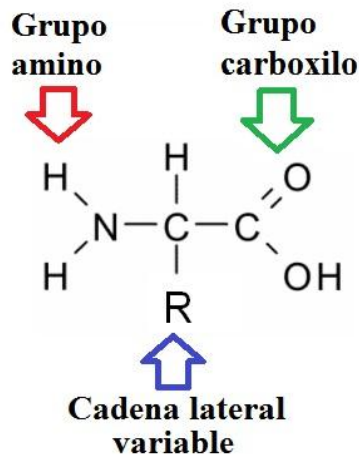


Figura 1: estructura general de un aminoácido. Presenta un carbono central unido a un grupo amino, un grupo carboxilo, un hidrogeno y a una cadena lateral variable.

Las proteínas tienen funciones muy diversas como enzimas y hormonas, que son necesarias para el buen funcionamiento de un organismo. La proteína mayoritaria de las plantas es una enzima llamada ribulosa 1,5 bifosfato oxigenasa/carboxilasa (RuBisCO). La Rubisco está situada en el estroma del cloroplasto y su función es catalizar el proceso de fijación de CO₂ en las plantas mediante la carboxilación. Este papel que desempeña es fundamental, ya que se encarga de catalizar la principal entrada de carbono a la biosfera. La Rubisco tiene dos substratos el CO₂ y el O₂, debido a esto presenta una ineficiencia catalítica en cuanto a la carboxilación al confundir el CO₂ y O₂ (Jordan y Ogren. 1981 y Tcherkez et al. 2006). Esta afinidad por el O₂ causa que la Rubisco en vez de captar moléculas de CO₂ capte moléculas de O₂ impidiendo la entrada de carbono y provocando la fotorrespiración. A consecuencia de la fotorrespiración la planta pierde eficiencia energética (Keys 1986).

La Rubisco ha ido evolucionando a lo largo de los años a partir de una proteína ancestral desarrollada por bacterias en un océano aún anóxico. Al haber una concentración muy baja de O₂ en el medio no era necesaria que la Rubisco fuera muy estricta al distinguir entre CO₂ y O₂ (Badger y Andrews 1987). La concentración de CO₂ ha disminuido debido al enterramiento de carbono orgánico, también ha aumentando la concentración de O₂ como resultado de la actividad de los organismos autótrofos oxigénicos (Nisbet et al. 2007). Esta disminución del ratio [CO₂]/[O₂] ha provocado una disminución de la eficiencia en la fijación de carbono de las plantas, en consecuencia las plantas han tenido que adaptarse a estos cambios.

OBJECTIVOS

Objetivo general

- Conocer cuáles son las variaciones en la distribución foliar del nitrógeno basándonos en la concentración de proteínas solubles foliares en los distintos grupos filogenéticos de plantas terrestres.

Objetivos específicos

- Determinar las variaciones en la distribución foliar de la Rubisco en los distintos grupos.
- Determinar si existe relación entre la distribución de Rubisco y la concentración de clorofilas.

MATERIAL Y METODOS

1. Material Vegetal

Para el presente estudio se seleccionaron 11 especies correspondientes a diferentes grupos filogenéticos de plantas terrestres (Tabla 1 y Figura 2). En este estudio las plantas han sido separadas en plantas no vasculares (*Leucobryum glaucum* y *Scorpiurum circinatum*) y plantas vasculares (*Sellaginella kraussiana*, *Equisetum arvense*, *Equisetum ramosissimum*, *Davallia canariensis*, *Phlebodium sp.*, *Cycas revolutans*, *Gynkgo biloba*, *Nymphaea sp.* y *Triticum aestivum*), también han sido separadas en plantas sin semillas (*Leucobryum glaucum*, *Scorpiurum circinatum*, *Sellaginella kraussiana*, *Equisetum arvense*, *Equisetum ramosissimum*, *Davallia canariensis* y *Phlebodium sp.*) y plantas con semillas (*Cycas revolutans*, *Gynkgo biloba*, *Nymphaea sp.* y *Triticum aestivum*). Se tomaron 5 muestras de *Leucobryum glaucum*, 5 de *Scorpiurum circinatum*, 6 de *Sellaginella kraussiana*, 4 de *Equisetum arvense*, 5 de *Equisetum ramosissimum*, 4 de *Davallia canariensis*, 5 de *Phlebodium sp.*, 5 de *Cycas revolutans*, 4 de *Gynkgo biloba*, 7 de *Nymphaea sp.* y 5 de *Triticum aestivum*. Cada una de las muestras fue tomada de un individuo diferente.

Especie	Descripción
<i>Leucobryum glaucum</i>	Musgo que crece formando unos cojines o montículos de color verde claro. Sus hojas tienen forma lanceolada y miden entre 6 y 9 mm. Hábitat: bosques y turberas ácidas. Distribución: América del norte, Europa central y del este.
<i>Scorpiurum circinatum</i>	Musgo que crece postrado de un color verde oscuro. Los tallos principales permanecen postrados y se bifurcan dando los tallos secundarios de 1 o 2 mm. Hábitat: ambientes húmedos y sobre madera en descomposición. Distribución: Europa occidental y central.
<i>Selaginella kraussiana</i>	Licófito con tallos herbáceos aplanados dorsoventralmente cubiertos de pequeñas hojas de pocos milímetros que crecen en el suelo formando esteras. Hábitat: bosques húmedos y umbríos. Distribución: originarias de Suráfrica.
<i>Equisetum arvense</i>	Planta tallos fértiles que liberan esporas y tallos estériles de hasta 20 cm fuertemente ramificados que tienen función fotosintética. Hábitat: zonas húmedas sobretodo arenosas. Distribución: Europa, Asia y América del norte.
<i>Equisetum ramosissimum</i>	Planta tallos fértiles que liberan esporas y tallos estériles de hasta 150 cm simples o ramificados que tienen función fotosintética. Hábitat: zonas húmedas sobretodo arenosas, como zonas costeras o orillas de ríos y lagos. Distribución: zonas templadas y tropicales tanto del hemisferio sur como del norte..
<i>Davallia canariensis</i>	Helecho perenne epífita, con hojas que miden entre 15 y 40 cm. Hábitat: roquedos silicios con pocos carbonatos. Distribución: oeste de la Península Ibérica, Marruecos y las Islas Canarias.
<i>Phlebodium sp.</i>	Helecho con rizomas rastreros que miden entre 1 y 7 cm de ancho, de los cuales salen hojas pinnadas o pinnatífidas de colores pálidos que miden entre 10 y 30 cm. Hábitat: bosques tropicales. Distribución: Suramérica.
<i>Cycas revolutans</i>	Planta dioica, con tallo de crecimiento apical del que salen las hojas esclerófilas pinnadas con foliolos planos de hasta 25cm curvados y espinosos. Hábitat: acantilados y lugares escarpados. Distribución: originaria de Japón.
<i>Gynkgo biloba</i>	Planta arbórea caducifolia que puede llegar a medir entre 20 y 30 m. Las hojas son bifurcadas y forman dos lóbulos, suelen medir entre 5 y 10 cm. Hábitat: lugares iluminados y irrigados. Distribución: originaria de China.
<i>Nymphaea sp.</i>	Planta acuática con rizomas subterráneos y con hojas flotantes de hasta 30 cm, con flores blancas de hasta 20 cm. Hábitat: aguas estancadas poco profundas. Distribución: Europa, Asia, África, América y Oceanía.
<i>Triticum aestivum</i>	Gramínea anual, con hojas de hojas planas y una espiga floral de terminal. Hábitat: cultivada. Distribución: Europa, Asia, África, América y Oceanía.

Tabla 1: Listado de las plantas utilizadas en este estudio, con su ubicación en el árbol evolutivo y una breve descripción morfológica.



Figura 2: Imágenes de las plantas utilizadas para realizar este estudio. Las imágenes están ordenadas numéricamente siguiendo el orden de la tabla 1.

2. Condiciones de cultivo

Todas las plantas, exceptuando las de *Nymphaea sp.*, fueron crecidas en sustrato comercial con perlita en una proporción de 70:30 (sustrato: perlita). En el caso de la *Nymphaea sp.* al ser una planta acuática permaneció en un estanque en el recinto de la UIB. Las plantas permanecieron en distintas condiciones dependiendo de sus requerimientos hídricos y de su tolerancia a la luz para que así estuvieran en condiciones óptimas para su crecimiento. Las plantas de *Leucobryum glaucum*, *Scorpiurum circinatum* y *Sellaginella kraussiana* permanecieron en la cámara de crecimiento del invernadero a condiciones de temperatura entre 20°C y 23°C, humedad relativa aproximada del 85% y un fotoperiodo aproximado de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con una intensidad de luz de 1.28 Klux. Las plantas de *Triticum aestivum*, *Cycas revolutans*, *Phlebodium sp.*, *Davallia canariensis*, *Equisetum arvense* y *Equisetum ramosissimum* permanecieron en el invernadero a condiciones de temperatura entre 18°C y 27°C, humedad relativa aproximada del 71% y un fotoperiodo aproximado de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con una intensidad de luz de 1.28 Klux. Las plantas de *Gynkgo biloba* y *Nymphaea sp.* permanecieron en el exterior de la UIB con una temperatura media anual entre 16 y 18 °C y unas precipitaciones medias anuales entre 450 y 650 mm³ al año. Todas las plantas fueron regadas con una solución nutritiva Hoagland al 50% con una frecuencia de 1 vez a la semana.

3. Peso específico foliar (PEF)

Para determinar la peso específico foliar, se extrajeron de 5 discos de hoja sin peciolo de 38.5 mm² de área de las especies de hoja de mayor tamaño que son *Phlebodium sp.*, *Gynkgo biloba*, *Nymphaea sp.* y *Triticum aestivum*, en las plantas de hoja de menor tamaño que son *Leucobryum glaucum*, *Scorpiurum circinatum*, *Sellaginella kraussiana*, *Equisetum arvense*, *Equisetum ramosissimum*, *Davallia canariensis* y *Cycas revolutans* se cortaron hojas sin peciolo y se les hizo una fotografía y se usó el software ImageJ para calcular el área de las hojas. Se pesaron todas las muestras para obtener el peso fresco y seguidamente se pusieron en una estufa ventilada a 60°C hasta obtener un peso constante, el cual se considera como peso seco.

Los cálculos de PEF se obtuvieron aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{PEF} = \frac{\text{Peso seco hoja (g)}}{\text{Área de las hojas (m}^2\text{)}}$$

4. Medidas bioquímicas

Extracción y cuantificación de los pigmentos fotosintéticos y Rubisco

Las pruebas bioquímicas se realizaron con hojas completamente desarrolladas. Se tomaron discos de hoja de 38.5 mm² de las especies con hoja de mayor tamaño que son *Phlebodium sp.*, *Gynkgo biloba*, *Nymphaea sp.* y *Triticum aestivum*, en las plantas con hojas de menor tamaño que son *Leucobryum glaucum*, *Scorpiurum circinatum*, *Sellaginella kraussiana*,

Equisetum arvense, *Equisetum ramosissimum*, *Davallia canariensis* y *Cycas revolutans* se cortaron de 1 a 10 hojas sin peciolo, dependiendo del tamaño de la hoja, y se les hizo una fotografía, usando el software ImageJ para calcular su área. Una vez colectadas las muestras, se congelaron en N₂ líquido para evitar que las proteínas y la clorofila se degraden. Posteriormente en un mortero se molieron las muestras de hoja hasta conseguir un polvo fino, una vez molidas las hojas se extrae en 1 ml tampón que contiene 50 mM Bicina-NaOH pH 8.0, EDTA 1 mM, 5% de PVP, 6% PEG 4000, 50 mM β-mercaptoetanol, 10 mM DTT y 50 mg de PVP (polivinilpirrolidona), hasta conseguir una solución homogénea. A continuación las muestras se centrifugaron a 13000 rpm a 4°C durante 2 minutos, descartando luego el precipitado.

Se tomaron 200 µl de extracto y se diluyeron en 800 µl de acetona, dejándose en oscuridad a 4°C durante 1 h. Posteriormente para la cuantificación de clorofilas se midió la absorbancia a 647 nm, a 664 nm y a 750 nm, usando un espectrofotómetro UV-Visible (Life Science UV/Vis Spectrophotometer DU730, Beckman Coulter). A partir de estas absorbancias se calculó la concentración de clorofilas a y b según el método de Porra, Thompson y Kriedemann (Porra, Thompson and Kriedemann 1989), usando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila a}_{(\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1})} = 12,25 \cdot \text{ABS}_{664} - 2,55 \cdot \text{ABS}_{647}$$

$$\text{Clorofila b}_{(\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1})} = 20,31 \cdot \text{ABS}_{647} - 4,91 \cdot \text{ABS}_{664}$$

$$\text{Clorofila total}_{(\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1})} = \text{Clorofila a}_{(\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1})} - \text{Clorofila b}_{(\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1})}$$

Cuantificación de la concentración de proteína soluble foliar (TSP)

Una sub-muestra del extracto obtenido se usó para la cuantificación de proteína soluble foliar y la cuantificación de Rubisco. La cuantificación de TSP se hizo según el método descrito por Bradford (Bradford, 1976). Para esto se pusieron a reaccionar 2 µl de extracto con 600 µl de reactivo Bradford diluido al 50% y se esperó 10 minutos. Luego se tomó la absorbancia a 595 nm con la ayuda de un espectrofotómetro UV-Visible (Life Science UV/Vis Spectrophotometer DU730, Beckman Coulter). Para la obtención de la concentración de proteínas a partir de la absorbancia se hizo, el día de la cuantificación, una recta patrón $y=mx+n$ (y =concentración de proteína, x =absorbancia a 595nm) de 7 puntos a partir de una solución de BSA (albumina de suero bovino) con concentraciones de proteína conocidas que van desde 0 a 8 µg/µl.

Cuantificación de la concentración de Rubisco

La cuantificación de Rubisco se realizó mediante electroforesis utilizando el método descrito por Aranjuelo et al. (2005). Para ello una alícuota del extracto se diluyó con el tampón de carga que contiene 65 mM Tris-HCl (pH 6,8), 25% de glicerol (v/v), 0,6 M β-mercaptoetanol, 2,5% SDS (w/v) y 0,01% de azul de bromofenol, hasta conseguir una concentración de proteína de 0.46 µg/µl en todas las muestras. Las muestras se calentaron a 96°C durante 5 minutos, y luego se tuvieron a temperatura ambiente hasta ser cargadas en un gel de Poliacrilamida al 12.5%. Se cargaron 6.5µl de muestra en cada pocillo de los geles para así

conseguir 3µg de proteína por muestra. De igual manera, se utilizó una cantidad conocida (480 ng) de Rubisco puras de *Triticum aestivum* como patrón interno, para poder corregir las variaciones en la tinción entre los diferentes geles. La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente a una corriente constante de 200 V. Los geles se fijaron con un tampón que contenía 30% de metanol y 15% de ácido acético durante 1 hora. Los geles se tiñeron durante 1 hora con azul brillante de Coomassie al 0,5% (w/v). El exceso de colorante de los geles fue eliminado dejando los geles 1 hora en agua destilada. Finalmente, los geles fueron escaneados con un escáner HP Deskjet F4180 (Hewlett-Packard Development Company, L.P.) y las bandas fueron cuantificadas usando el programa informático Quantity One versión 4.6.3 (Quantity One v 4.6.3, 2006, Bio-Rad Laboratories). Para la obtención de la concentración de Rubisco a partir de Intensidad·mm⁻² se hizo una recta patrón $y=577.2x$ (y =concentración de Rubisco, x =Intensidad·mm⁻²) usando concentraciones de Rubisco conocidas.

5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el software Statistica versión 12.0 (Statistica v12.0, 2013, Statsoft) usando el análisis de las varianzas de una sola variable. Se compararon los parámetros entre especies, entre plantas vasculares y no vasculares y entre plantas con semillas y plantas sin semillas. Los parámetros considerados para el análisis incluyen la clorofilas totales (a+b) por área y por peso seco, proteína total soluble por área y por peso seco, concentración de la Rubisco por área y por peso seco, la relación entre la concentración de Rubisco y el porcentaje de TSP y la relación entre la concentración de Rubisco y las clorofilas totales (a+b). En todos los casos se utilizó el ANOVA para determinar la existencia de diferencias significativas entre los resultados, medidos con el test de Duncan ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La comparación interespecífica mostró una tendencia a incrementar la concentración de proteínas y de Rubisco en plantas más adaptadas al medio terrestre. Las concentraciones de Rubisco en *Leucobryum glaucum* y *Scorpiurum circinatum* no se pudieron cuantificar debido a que estas son muy bajas. Al comparar las concentraciones de proteínas y de Rubisco en peso seco no se puede apreciar tan claramente esta tendencia. En las concentraciones de clorofilas tanto por área como por peso seco tampoco se puede ver una tendencia clara. Para poder evaluar mejor los resultados obtenidos es necesario juntar las especies por grupos para poder compararlas mejor.

Tabla 2: Comparación entre todas las especies del peso específico foliar (PEF), la concentración de clorofilas a+b (Chl a+b) por área (mm²) y por peso seco (g), la concentración de proteína soluble foliar (PSF) por área (mm²) y por peso seco (g), la concentración de Rubisco (Ru) por área (mm²) y por peso seco (g), la relación entre la concentración de Rubisco y de proteína y la relación entre la concentración de Rubisco y clorofila. Todos los valores exceptuando el peso específico foliar están representados por sus medias de 4 a 7 valores ± el error estándar y sus diferencias significativas obtenidas mediante el test Duncan con p<0.05.

Sp.	PEF (g·m ⁻²)	[Chl a+b] (μg·mm ⁻²)	[Chl a+b] (μg·g ⁻¹)	[PSF] (μg·mm ⁻²)	[PSF] (μg·g ⁻¹)	[Ru] (μg·mm ⁻²)	[Ru] (μg·g ⁻¹)	[Ru]/[PSF] (μg·μg ⁻¹)	[Ru]/[Chl a+b] (μg·μg ⁻¹)
<i>Leucobryum glaucum</i>	31.1	3.4±0.2 ^d	373±19 ^a	0.24±0.01 ^a	26.5±0.8 ^a	-	-	-	-
<i>Scorpiurum circinatum</i>	347.9	17.2±1.2 ^{ac}	52±3 ^a	1.36±0.06 ^{ab}	4.2±0.2 ^a	-	-	-	-
<i>Selaginella kraussiana</i>	61.1	21.2±2.3 ^a	3852±555 ^d	2.21±0.19 ^b	397.4±43.7 ^c	0.45±0.07 ^{ab}	83.5±16.2 ^b	0.20±0.02 ^d	0.023±0.004 ^{ab}
<i>Equisetum arvense</i>	372.9	42.2±0.9 ^b	4990±171 ^e	2.27±0.10 ^b	268.3±9.2 ^b	0.30±0.04 ^{ab}	35.5±5.2 ^c	0.13±0.02 ^{bc}	0.007±0.001 ^a
<i>Equisetum ramosissimum</i>	85.5	39.8±1.5 ^b	1048±76 ^{bc}	2.10±0.08 ^b	55.6±4.9 ^a	0.57±0.06 ^{bc}	14.9±1.7 ^a	0.27±0.02 ^a	0.014±0.001 ^a
<i>Davallia canariensis</i>	45.9	23.8±3.1 ^a	643±112 ^{ab}	1.63±0.09 ^b	47.7±12.7 ^a	0.20±0.01 ^{ab}	5.7±1.4 ^a	0.12±0.01 ^b	0.009±0.002 ^a
<i>Phleboium sp.</i>	90.3	39.8±4.5 ^b	341±39 ^a	5.67±0.46 ^c	48.5±4.0 ^a	0.99±0.05 ^c	8.5±0.4 ^a	0.18±0.02 ^{cd}	0.026±0.003 ^{ab}
<i>Cycas revolutans</i>	330.3	40.4±3.5 ^b	1366±119 ^c	6.64±0.48 ^c	224.5±16.4 ^b	1.96±0.27 ^d	66.2±9.2 ^b	0.29±0.04 ^a	0.048±0.004 ^b
<i>Gynkgo biloba</i>	92.4	12.3±0.2 ^c	242±3 ^a	2.13±0.08 ^b	42.0±1.7 ^a	0.54±0.05 ^{bc}	10.7±1 ^a	0.27±0.01 ^a	0.044±0.004 ^b
<i>Nymphaea sp.</i>	106.1	19.5±2.9 ^{ac}	49±7 ^a	13.36±0.75 ^d	33.6±1.9 ^a	2.14±0.30 ^{de}	5.4±0.8 ^a	0.16±0.02 ^{bcd}	0.121±0.021 ^c
<i>Triticum aestivum</i>	33.3	58.7±2.2 ^e	290±11 ^a	8.70±0.30 ^e	43.0±1.5 ^a	2.58±0.12 ^e	12.8±0.6 ^a	0.30±0.01 ^a	0.044±0.001 ^b

Plantas no vasculares y plantas vasculares

El origen y la evolución de las plantas terrestres a mediados del Paleozoico (480 y 360 millones de años atrás) fue un acontecimiento importante en la historia de la vida, con consecuencias de largo alcance para la evolución de los organismos terrestres y entornos globales (Kenrick y Crane 1997).

El principal problema al que se enfrentaron estas plantas fue la deshidratación, para ello desarrollaron varias estrategias a lo largo de la evolución para combatir esta falta de agua como la cutícula. Las plantas con sistema vascular son capaces de resistir a la deshidratación de manera más eficaz que las plantas que carecen de él, gracias a una cutícula más desarrollada y a que poseen estomas. Los estomas son los poros en la superficie de la hoja a través del cual las plantas regulan la absorción de dióxido de carbono (CO₂) para la fotosíntesis en contra de la pérdida de agua a través de la transpiración (Haworth et al. 2011). Las plantas no vasculares no pueden combatir la deshidratación de manera tan eficaz por lo que son más susceptibles a sufrir desecación. Debido a que no poseen un sistema efectivo para absorber agua dependen de la humedad relativa del aire para obtener agua y no deshidratarse. Para combatir este problema los briofitos emplean una estrategia de protección celular junto con la inducción de un mecanismo de recuperación / reparación después de la rehidratación. Esta recuperación se da gracias a unas proteínas llamadas rehidrinas encargadas de estabilizar y recuperar las membranas durante la rehidratación (Melvin et al. 2005; Oliver et al. 2005).

En los resultados del experimento no se pudo cuantificar la cantidad de Rubisco de las plantas no vasculares (tabla 3). Esto fue debido a que al tener una cantidad tan baja de Rubisco no apareció ninguna banda distinguible en la posición de la Rubisco en los geles de poliacrilamida. La síntesis de las proteínas rehidrinas y las otras proteínas del mecanismo de recuperación / reparación supone un gran gasto de nitrógeno para las plantas no vasculares, mientras que las plantas vasculares disponen de más nitrógeno al no tener que sintetizar estas proteínas. El no tener que sintetizar estas proteínas podría explicar las diferencias entre la concentración de Rubisco en plantas no vasculares y vasculares, ya que estas últimas dispondrán de más nitrógeno que podrían invertir en la producción de Rubisco (Melvin et al. 2005; Oliver et al. 2005).

Tabla 3: Concentración de clorofilas a+b (Chl a+b) por área (mm²) y por peso seco (g), concentración de proteína soluble foliar (PSF) por área (mm²) y por peso seco (g), concentración de Rubisco (Ru) por área (mm²) y por peso seco (g), la relación entre concentración de Rubisco y de proteína y la relación entre la concentración de Rubisco y clorofila en especies vasculares y no vasculares. Todos los valores están representados por sus medias de 4 a 7 réplicas \pm el error estándar y sus diferencias significativas obtenidas mediante el test Duncan con $p < 0.05$.

Sp.	[Chl a+b] ($\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-2}$)	[Chl a+b] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	[PSF] ($\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-2}$)	[PSF] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	[Ru] ($\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-2}$)	[Ru] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	[Ru]/[PSF] ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)	[Ru]/[Chl a+b] ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)
Vasculares	10.3 \pm 2.4 ^a	213 \pm 54 ^a	0.80 \pm 0.19 ^a	15.3 \pm 3.7 ^a	-	-	-	-
No vasculares	32.7 \pm 2.2 ^b	1382 \pm 257 ^b	5.48 \pm 0.63 ^b	131.3 \pm 20.6 ^b	1.16 \pm 0.14 ^a	28.0 \pm 4.9 ^a	0.21 \pm 0.01 ^a	0.042 \pm 0.006 ^a

Las proteínas rehidrinas no son la única estrategia para combatir la deshidratación que poseen las plantas vasculares. La acumulación de azúcares solubles se ha correlacionado con la adquisición de tolerancia a la desecación en las plantas y otros organismos (Crowe et al, 1992). Esta acumulación de azúcares podría afectar a la concentración de proteínas solubles. En la tabla 3 se aprecian diferencias significativas entre la concentración de proteínas solubles, tanto por peso seco como por área, estas diferencias se podrían explicar por una mayor concentración de azúcares solubles en las plantas no vasculares que en las vasculares.

Las plantas vasculares al poseer mayor cantidad de Rubisco pueden fijar una cantidad mayor de CO₂, de manera que poseen mayor cantidad de carbono para la fotosíntesis. Por lo tanto es lógico pensar que las plantas vasculares poseerán mayor cantidad de clorofilas para poder utilizar todo este CO₂ fijado. Como se aprecia en la tabla 3 hay diferencias significativas entre la cantidad de clorofilas totales, tanto en peso seco como en superficie de hoja, entre las plantas vasculares y las no vasculares.

Plantas sin semillas y plantas con semillas

El método de reproducción de las primeras plantas terrestres consiste en la liberación de esporas haploides por parte del esporofito diploide y estas germinan formando el prótalo haploide. El prótalo produce esperma en los anteridios y óvulos en los arquegonios. El esperma requiere de mucha humedad para viajar a través del suelo para llegar a los anteridios de otro prótalo para así fecundar los óvulos y formar el embrión diploide. Este embrión volverá a dar el esporofito diploide y así cierra el ciclo. Este embrión también requiere de mucha humedad para poder sobrevivir. Al poder darse solo en ambientes muy húmedos este ciclo reproductivo impide a la planta colonizar ambientes más áridos.

La aparición de las semillas que permitían aislar el embrión del exterior y protegerlo de factores ambientales externos como la falta de agua y también el desarrollo del polen que permitía proteger los gametos masculinos de la desecación, permitió a las plantas colonizar nuevos ambientes más áridos. Esta independencia del agua supuso una ventaja evolutiva sobre las plantas sin semillas que requerían del agua para reproducirse (Iwatsuki y Raven 1997).

A lo largo de la evolución cuando un organismo desarrolla una adaptación que le confiere una ventaja evolutiva muy grande respecto a otros, este tiende a diversificarse y a colonizar nuevos ecosistemas o ecosistemas donde ya había organismos desplazándolos. Ejemplos de estas adaptaciones en las plantas han sido la aparición de la cutícula que permitió la salida al medio terrestre, la aparición del sistema vascular o el desarrollo de semillas que ha sido mencionado anteriormente. Esta última adaptación ha afectado muy poco a la fisiología de las plantas terrestres. Es verdad que hay diferencias fisiológicas entre las plantas con semillas y las plantas sin semillas como modificaciones del sistema vascular o la evolución de las traqueidas hacia los vasos y otros cambios en el xilema (Sperry 2003; Friedman y Cook 2000). Pero, la ventaja que adquirieron las plantas con semillas no supuso un cambio en la

estructura y la composición de la planta tan grande como el paso que dieron las plantas al desarrollar el sistema vascular (tabla 3).

Al comparar las plantas con semillas con las plantas sin semillas (tabla 4) observamos que el grupo más adaptado, en este caso las plantas con semillas, no presenta niveles significativamente superiores en concentración de clorofila y proteína foliar soluble. De hecho las plantas sin semillas presentan niveles significativamente superiores de PSF por peso seco y clorofilas totales por área, también presenta niveles superiores de clorofila por peso seco, aunque no significativamente superiores. Las plantas con semillas solo presentan niveles superiores de PSF por área pero no significativamente superiores. En cuanto a la Rubisco observamos que la concentración de Rubisco por área es significativamente superior en las plantas con semillas, pero la concentración de Rubisco por peso seco es superior en plantas sin semillas. Cabe esperar que las mejoras fisiológicas de las plantas con semillas (Sperry 2003; Friedman y Cook 2000) conllevan una mayor concentración de clorofilas y proteínas y por lo tanto Rubisco al ser más eficientes en el transporte de agua y otras sustancias, pero no concuerda con los resultados obtenidos. Aunque al comparar la concentración de Rubisco y la concentración de Clorofilas obtenemos que en las plantas con semillas hay una relación de concentración de Rubisco / concentración de Clorofilas significativamente mayor que en plantas sin semillas, de manera que las clorofilas de las plantas con semillas tengan mayor cantidad de CO₂ disponible. Esta diferencia podría ser una adaptación a la disminución del ratio [CO₂]/[O₂] que ocurre desde la aparición de los primeros organismos autótrofos oxigénicos (Nisbet et al. 2007), compensando así la inespecificidad de la Rubisco al confundir el CO₂ y O₂ (Jordan y Ogren. 1981 y Tcherkez et al. 2006)

Tabla 4: Concentración de clorofilas a+b (Chl a+b) por área (mm²) y por peso seco (g), la concentración de proteína soluble foliar (PSF) por área (mm²) y por peso seco (g), la concentración de Rubisco (Ru) por área (mm²) y por peso seco (g), la relación entre la concentración de Rubisco y de proteína y la relación entre la concentración de Rubisco y clorofila en especies con semillas y sin semillas. Todos los valores están representados por sus medias de 4 a 7 valores \pm el error estándar y sus diferencias significativas obtenidas mediante el test Duncan con $p < 0.05$.

Sp.	[Chl a+b] ($\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-2}$)	[Chl a+b] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	[PSF] ($\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-2}$)	[PSF] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	[Ru] ($\mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-2}$)	[Ru] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	[Ru]/[PSF] ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)	[Ru]/[Chl a+b] ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)
Sin Semillas	26.2 \pm 2.5 ^a	1610 \pm 326 ^a	2.23 \pm 0.28 ^a	127.1 \pm 26.5 ^a	0.52 \pm 0.06 ^a	32.6 \pm 7.5 ^a	0.19 \pm 0.01 ^a	0.017 \pm 0.002 ^a
Con semillas	22.0 \pm 3.4 ^b	309 \pm 98 ^a	5.77 \pm 0.78 ^a	56.2 \pm 14.9 ^b	1.29 \pm 0.16 ^b	15.3 \pm 4.8 ^a	0.17 \pm 0.01 ^b	0.048 \pm 0.008 ^b

Hay que tener en cuenta que los resultados de la tabla 4 han sido obtenidos comparando 4 plantas con semillas con 7 plantas sin semillas. Las plantas con semillas, y en concreto las angiospermas, son un grupo muy diverso tanto morfológicamente como ecológicamente (Soltis y Soltis 2004). En futuros estudios sería necesario comparar más especies de plantas con semillas para poder obtener resultados más precisos.

Relación entre la concentración de Rubisco y la concentración de proteínas solubles foliares

Al observar las concentraciones de proteínas y de Rubisco (figura 3), vemos que tanto la concentración de proteínas como la de Rubisco han aumentado a lo largo de la evolución. Esto es debido a que a largo de la evolución las plantas han ido desarrollando varias estrategias o adaptaciones para obtener más nitrógeno, como simbiosis con bacterias u hongos, ya que la concentración de proteínas de una planta depende mayoritariamente de la cantidad de nitrógeno de la que dispone dicha planta (Margalef 1999). Al ser la Rubisco una proteína también dependerá su concentración del nitrógeno del que disponga la planta, de manera que su concentración también va aumentando a lo largo de la evolución. Pero al comparar la concentración de Rubisco y la concentración de proteínas (figura 3) vemos que la relación concentración de Rubisco / concentración de proteína se mantiene constante, por lo que las plantas siempre han invertido la misma proporción de nitrógeno en Rubisco.

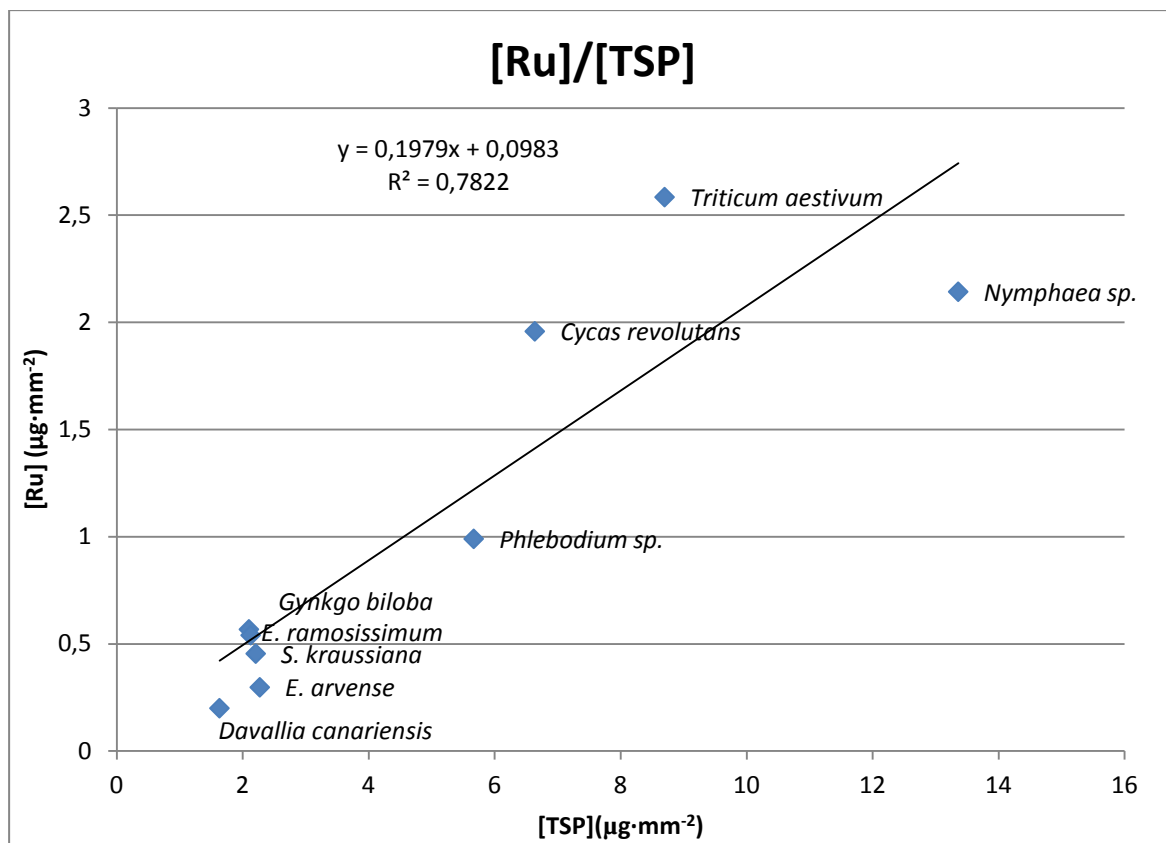


Figura 3: Ratio entre la concentración de Rubisco (Ru) y la concentración de proteínas solubles foliares (TSP).

Relación entre la concentración de Rubisco y la concentración de clorofilas totales

Al ser la fijación de CO₂ por Rubisco un paso limitante de la velocidad en el proceso de fotosíntesis sería lógico pensar que hubiese una correlación entre la concentración de Rubisco y la concentración de clorofilas. Pero, en la figura 4 no se aprecia dicha correlación debido a que la cantidad de CO₂ fijado por la planta no depende solo de la concentración de Rubisco, sino que también influye la afinidad de la Rubisco por el CO₂ (Galmés et al. 2014) y los mecanismos de captación y concentración de CO₂ (Haworth et al. 2011).

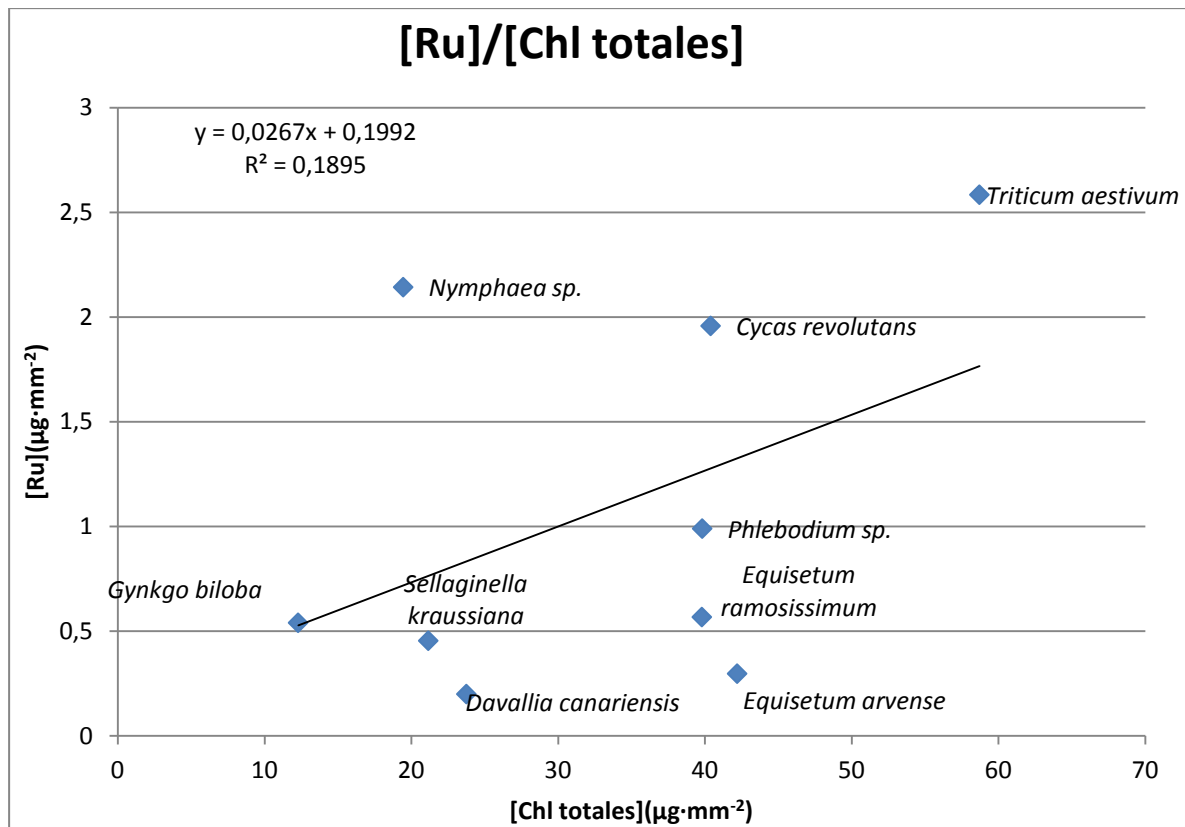


Figura 4: Ratio entre la concentración de Rubisco (Ru) y la concentración de clorofilas (Chl totales).

Conclusiones

La mayoría del nitrógeno foliar se encuentra en forma de proteínas. Basándonos en esto podemos ver que existe una tendencia a incrementar la concentración de proteínas, por lo tanto también del nitrógeno, en los grupos filogenéticos más adaptados al medio terrestre. Esta diferencia es más marcada al comparar plantas con sistema vascular y plantas sin él, que al comparar plantas con semillas con plantas sin semillas. Al ser una proteína la Rubisco también tiende a incrementar su concentración en los grupos filogenéticos más adaptados al medio terrestre, pero su proporción respecto a otras proteínas no presenta cambios significativos de un grupo filogenético a otro. El principal factor limitante de la fotosíntesis es la fijación de CO₂ catalizada por la proteína Rubisco. A pesar de esto al comparar las concentraciones de Rubisco y clorofila en las distintas plantas no se puede apreciar una relación debido a que la cantidad de CO₂ fijado por la planta no depende solo de la concentración de Rubisco.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amigos por su apoyo. Al Dr. Jeroni Galmés por su ayuda y su paciencia. A Marcel, Alejandro, Xurxo, Marc, Miquel, Pep y a todos los del área de fisiología vegetal por su gran colaboración durante todo el proceso del trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- **Aranjuelo I, Pérez P, Hernández L, Irigoyen J J, Zita G, Martínez-Carrasco R y Sánchez-Díaz M.** 2005. The response of nodulated alfalfa to water supply temperature and elevated CO₂: photosynthetic downregulation. *Physiologia Plantarum* 123: 348–358
- **Bradford M M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72:248-54.
- **Badger M R , Andrews T J, Whitney S M, Ludwig M , Yellowlees D C, Leggat W y Price G D.** 1998. The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based CO₂- concentrating mechanisms in algae. *Canadian Journal of Botany* 76, 1051–1071.
- **Bainbridge G, Madgwick P, Parmar S, Mitchell R, Paul M, Pitts J y Parry M A J.** 1995. Engineering Rubisco to change its catalytic properties. *Journal of Experimental Botany* 46, 1269–1276.
- **Crowe J H, Hoekstra F A y Crowe L M.** 1992. Anhydrobiosis. *Ann. Rev. Physiol,* 54:579-599
- **Friedman W E y Cook M E.** 2000. The origin and early evolution of tracheids in vascular plants: integration of palaeobotanical and neobotanical data. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*; 355(1398): 857–868.
- **Galmés J, Kapralov M V, Andralojc P J, Conesa M A, Keys A J, Parry M A J y Flexas J.** 2014. Expanding knowledge of the Rubisco kinetics variability in plant species: environmental and evolutionary trends *Plant, Cell and Environment*
- **Haworth M, Kingston C y McElwain J C.** 2011. Stomatal control as a driver of plant evolution. *Journal of Experimental Botany* 62, 2419–2423.
- **Iwatsuki K y Raven P H.** 1997. Evolution and Diversification of Land Plants. *Berlin, Germany: Springer-Verlag.*
- **Jordan y Ogren.** 1981. Species variation in the specificity of ribulose biphosphate carboxylase/oxigenase. *Nature.* 291:513 – 515.
- **Kenrick P y Crane P R.** 1997. The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389, 33–39.
- **Keys A J.** 1986. Rubisco: its role in photorespiration. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 313, 325–336.
- **Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685
- **Margalef R.** 1999. *Ecología.* Ed. Omega. Barcelona.
- **Martín del Molino I M, Martínez-Carrasco R, Pérez P, Hernández L, Morcuende R y Sánchez de la Puente L.** 1995. Influence of nitrogen supply and sink strength on changes in leaf nitrogen compounds during senescence in two wheat cultivars. *Physiol Plant* 95: 51–58.
- **Nelson D K y Cox M M.** 2000. *Lehninger Principios de Bioquímica.* 3a edición. Omega, Barcelona.

- **Nisbet E G, Grassineau N V, Howe C J, Abell P I, Regelous M y Nisbet R E R.** 2007. The age of RubisCO: the evolution of oxygenic photosynthesis. *Geobiology* 5, 311–355.
- **Oliver M J, Velten J, y Mishler B D.** 2005. Desiccation Tolerance in Bryophytes: A Reflection of the Primitive Strategy for Plant Survival in Dehydrating Habitats *Integrative and Comparative Biology* 45(5):788-799.
- **Porra R J, Thompson W A y Kriedemann P E.** 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophylls standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 985: 384–394.
- **Soltis P S y Soltis D E** 2004 The origin and diversification of angiosperms *American Journal of Botany* 91: 1614-1626
- **Sperry J S.** 2003. Evolution of water transport and xylem structure, *Int. J. Plant Sci*, , 164, S115-S127
- **Tcherkez G, Farquhar G D y Andrews T J.** 2006. Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose biphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7246–7251.
- **Torre S, Fjeld T, Gislerod H R y Moe R** 2003 Leaf anatomy and stomatal morphology of greenhouse roses grown at moderate or high air humidity. *Scientia hort* 128 (4): 598-602
- **Vatén A y Bergmann D C.** 2012. Mechanisms of stomatal development: an evolutionary view *EvoDevo* 3:11
- **Watson L.** 2006. The taxonomic significance of stomatal morphology in Epacridaceae. *New physiologist* 61