



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de Ciències

**Memòria del Treball de Fi de Grau**

# Estudi de la capacitat fotosintètica a espècies basals de la filogènia dels Cormòfits

Miquel Nadal Nadal

**Grau de Biologia**

Any acadèmic 2013-14

DNI de l'alumne: 43206860A

Treball tutelat per Jaume Flexas Sans

Departament de Biologia



S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Fotosíntesi, equisets, falgueres, Gimnospermes, Angiospermes, conductància estomàtica, conductància del mesòfil, resposta estomàtica, limitacions fotosintètiques



## ÍNDEX

Resum .....	pàg. 4
Introducció .....	pàg. 4
Material i Mètodes .....	pàg. 7
Resultats .....	pàg. 15
Discussió .....	pàg. 25
Conclusions .....	pàg. 27
Agraïments .....	pàg. 27
Referències .....	pàg. 28

## RESUM

La fotosíntesi, procés fisiològic clau per a la vida a la Terra, ha experimentat un procés evolutiu a través de tota la història evolutiva de les plantes, des dels primers grups que colonitzaren el medi terrestre fins a les Angiospermes. Els principals factors que condicionen la fotosíntesi són la conductància estomàtica (incloent la resposta estomàtica enfront diferents estímuls ambientals), la conductància del mesòfil i la maquinària bioquímica. No obstant, es tenen molt poques dades completes de les espècies i grups més basals, com els equisets, les falgueres, les Gimnospermes i les Angiospermes basals. El present treball pretén ampliar el coneixement de la fotosíntesi en els grups més basals, i per això s'estudiaren 11 espècies dels grups següents: equisets, falgueres, Gimnospermes i Angiospermes (nenúfars). Es realitzaren mesures d'intercanvi de gasos i fluorescència per a determinar els paràmetres fotosintètics en condicions òptimes i també s'observà la resposta estomàtica enfront a variacions en la irradiància i el CO<sub>2</sub>. Els resultats mostraren una resposta estomàtica variada entre els grups, on la majoria d'espècies mostraren una resposta baixa, especialment per al CO<sub>2</sub>. En la caracterització dels paràmetres fotosintètics s'observà un augment de la fotosíntesi en avançar la filogènia, relacionada amb l'augment general de les conductàncies i els components bioquímics. Finalment, s'observà una disminució progressiva de la limitació per la conductància del mesòfil acompanyada d'un augment en la limitació de la fotosíntesi per la conductància estomàtica a través de les espècies estudiades.

## INTRODUCCIÓ

La història evolutiva de les plantes vasculares (cormòfits) es remunta al període Silúric, fa més de 430 Ma. Des del moment en que sorgiren les primeres plantes terrestres, els vegetals han colonitzat pràcticament tots els hàbitats terrestres i dominen els ecosistemes, constituint la base de la vida fora de l'aigua. Les plantes terrestres i, dins aquestes, els cormòfits, constitueixen un grup monofilètic (Qui *et al*, 2007). Si bé els briòfits (divisions o fila Anthocerophyta, Hepatophyta i Bryophyta) foren les primeres en colonitzar el medi terrestre, les plantes vasculares presenten una sèrie d'adaptacions tant morfològiques com fisiològiques (vasos conductors, cutícula, etc.) que han permès el seu enorme èxit. El grup més primitiu de plantes vasculares és el dels licòfits (Lycophyta), actualment representats per gèneres com *Selaginella* o *Isoetes*. Els equisets (Sphenophyta, únicament representats en l'actualitat pel gènere *Equisetum*) i les falgueres (Pteridophyta), juntament amb els licòfits, tingueren una gran diversitat i dominaren la vegetació durant el període Carbonífer (360-300 Ma). Actualment, les falgueres constitueixen el segon grup de plantes amb major nombre d'espècies (unes 12000) després de les Angiospermes. Les plantes amb llavor (espermatòfits o fanerògames) començaren a desenvolupar-se durant el Carbonífer, però fou a partir del Pèrmic (300-250 Ma) quan adquiriren el paper principal en els ecosistemes terrestres. L'assecament del clima durant el Pèrmic constituí un factor selectiu que afavorí els espermatòfits degut a que aquests toleren millor la manca d'aigua que les plantes sense llavor. Les Gimnospermes foren els primers espermatòfits en aparèixer (derivats del grup extint conegut com "Progimnospermes"). Es componen de quatre fila amb representants en l'actualitat (Cycadophyta, Ginkgophyta, Gnetophyta i Coniferophyta) i una sèrie de fila extints (Díaz *et al*, 2004). Les Gimnospermes assoliren el seu màxim apogeu durant el Mesozoic. Dins les Gimnospermes actuals es troben gèneres com *Ginkgo* o *Cycas*, autèntics "fòssils vivents", pràcticament inalterats des del període Juràssic (150 Ma), reminiscents de grups anteriorment diversos (Nagalingum *et al*, 2011). Dins el regne vegetal les Angiospermes són, sens dubte, el grup més exitós i divers (més de 250000 espècies, aproximadament el 90% de totes les espècies de plantes). Aquestes aparegueren a principis del període Cretàcic (140 Ma) però no fou fins a finals d'aquest període (65 Ma) quan començaren a dominar el paisatge. Característiques com l'aparició del pistil i el desenvolupament de la flor, així com la gran plasticitat morfològica, contribuïren a l'enorme èxit de les Angiospermes. Actualment, *Amborella trichopoda* i la família dels nenúfars (Nymphaeaceae) són considerades les Angiospermes més basals (Feild *et al*, 2009; Qui *et al*, 2007).

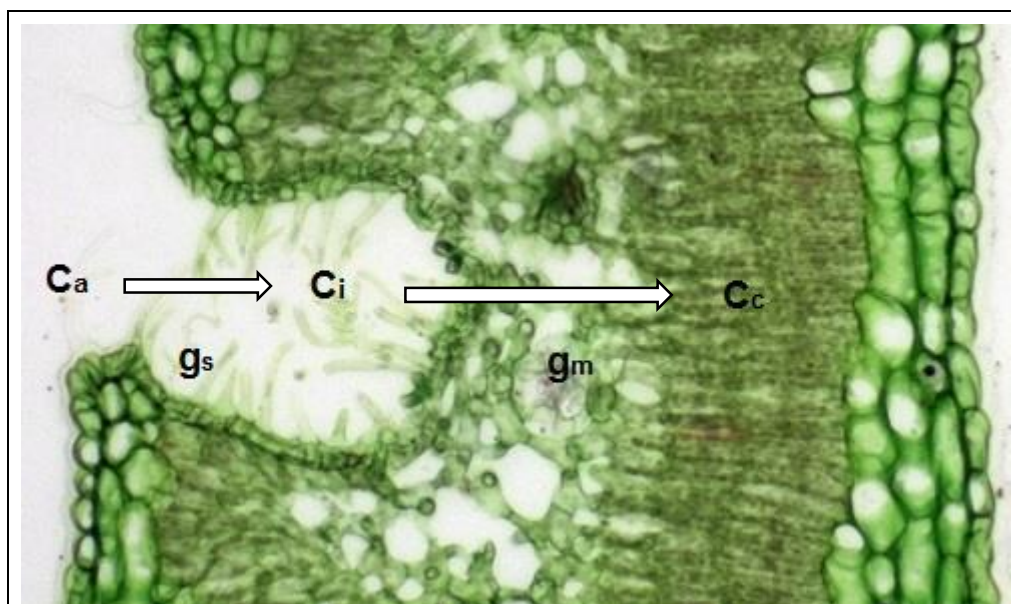
Es coneix en profunditat la filogènia i l'evolució morfològica de les plantes vasculars; en canvi, els estudis sobre l'evolució de la fisiologia relacionada amb la fotosíntesi, són més escassos (Haworth *et al*, 2011; Flexas *et al*, 2012). La fotosíntesi és un procés clau per a la vida al nostre planeta, ja que permet la incorporació de nova matèria orgànica a l'ecosistema, constituint per tant la base de tota la producció primària. No obstant, actualment la majoria de les dades sobre el rendiment fotosintètic i la seva regulació corresponen generalment a Angiospermes superiors i, especialment, a plantes model i cultius. La informació sobre l'evolució fisiològica de la fotosíntesi és escassa, en quant a dades referents a espècies considerades com a "primitives" (Haworth *et al*, 2011; Flexas *et al*, 2012). En el cas de les Angiospermes basals, incloent *Amborella* i espècies de la família Nymphaeaceae, s'han reportat valors de fotosíntesi i conductància, encara que sense aprofundir en les limitacions fotosintètiques d'aquestes espècies (Feild *et al*, 2009).

La fotosíntesi es troba condicionada per dos factors: la difusió del CO<sub>2</sub> a través dels estomes ( $g_s$ ) i el mesòfil foliar ( $g_m$ ) (factors biofísics) i la capacitat de la maquinària fotosintètica dels cloroplasts en la conversió d'energia lumínica en química (factors bioquímics) (Sharkey *et al*, 2007; Flexas *et al*, 2012).

La presència d'estomes a les plantes ha suposat l'adquisició de la capacitat de controlar quantitativament l'intercanvi de gasos i constitueix un dels trets que permeteren la colonització plena del medi terrestre. Si bé totes les plantes vasculars presenten estomes, la capacitat de controlar la seva obertura varia entre els diferents grups (Haworth *et al*, 2011). Aquest control és important per a ajustar el balanç entre l'entrada de CO<sub>2</sub> i la pèrdua d'aigua per transpiració; la relació entre aquests dos valors rep el nom d'eficiència en l'ús de l'aigua (WUE, en anglès) i és un concepte vital per entendre les adaptacions i l'evolució de les plantes terrestres (Gago *et al*, 2014; Brodribb *et al*, 2009). El WUE constituï un fort factor de pressió selectiva en les primeres etapes de la evolució de les plantes i, concretament, dels estomes (McAdam & Brodribb, 2012). En general, s'ha observat un increment en el WUE al llarg de la història evolutiva de les plantes terrestres (Haworth *et al*, 2011). El valor de  $g_s$  es veu condicionat per la densitat estomàtica i pel grau d'obertura, podent aquest darrer variar a curt termini (minuts) en resposta a diferents estímuls: llum, CO<sub>2</sub>, humitat, temperatura, etc. (Haworth *et al*, 2011). Concretament per al CO<sub>2</sub>, s'ha observat que les respostes per al baix (<380  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ) i per a l'alt CO<sub>2</sub> (>380  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ) són independents; la resposta al baix CO<sub>2</sub> és obrir estomes per augmentar la concentració de substrat (CO<sub>2</sub>) i evitar l'acumulació d'elements fotoreductors, mentre que la resposta al l'elevat CO<sub>2</sub> és tancar estomes i estalviar aigua sense comprometre la fotosíntesi (Brodribb *et al*, 2009). S'ha documentat àmpliament la resposta estomàtica a curt termini en un gran nombre d'Angiospermes, on la resposta és ràpida i eficient (valors elevats de WUE), i en algunes espècies de coníferes (Gimnospermes), falgueres i licòfits, on la resposta a la llum i a l'elevat CO<sub>2</sub> és menor o inexistent (Brodribb *et al*, 2009; McAdam & Brodribb, 2012; Brodribb & McAdam, 2013). Les respostes al CO<sub>2</sub> varien en condicions de llum i obscuritat, sent les Angiospermes les úniques que responen a l'elevat CO<sub>2</sub> en obscuritat (Brodribb & McAdam, 2013). A més, en falgueres la resposta depèn en gran mesura de l'estat hídric de la fulla (tancament estomàtic passiu en perdre turgor) i no de la regulació per àcid abscísic, al contrari que les Angiospermes i Gimnospermes (Brodribb & McAdam, 2011; McAdam & Brodribb, 2012; Brodribb & McAdam, 2013). Recentment s'ha observat en falgueres que les respostes a la llum i al dèficit de pressió de vapor estan coordinades, mentre que les respostes a la llum i al CO<sub>2</sub> són independents (Creese *et al*, 2014). En altres cormòfits basals, no obstant, la informació és escassa. Únicament es troben estudis en *Ginkgo biloba*, on s'ha observat una baixa resposta a la llum al llarg del dia (Pandey *et al*, 2003) i l'aclimatació a elevat CO<sub>2</sub> ambiental (Beerling *et al*, 1998) així com una baixa resposta a curt termini al CO<sub>2</sub> (Haworth *et al*, 2013; Brodribb & McAdam, 2013). Els estudis sobre Angiospermes basals, com els nenúfars (Nymphaeaceae), també són limitats (Snir *et al*, 2006; Feild *et al*, 2009). No hi ha estudis sobre la resposta de la  $g_s$  en espècies dels gèneres *Equisetum* o *Cycas*, si bé per a algunes d'aquestes espècies s'han reportat alguns valors de fotosíntesi i conductància (Carríquí *et al*, 2014; Marler & Willis, 1997).

A banda de la conductància estomàtica ( $g_s$ ), la fotosíntesi també es troba limitada i condicionada per la conductància del mesòfil ( $g_m$ ), que recentment ha adquirit una major

importància en la caracterització de la capacitat fotosintètica (Flexas *et al*, 2012; Bernacchi *et al*, 2002). A la **Figura 1** es mostra el paper d'ambdues conductàncies en la fulla, juntament amb els diferents valors de CO<sub>2</sub>: ambiental (C<sub>a</sub>), intercel·lular (C<sub>i</sub>) i al lloc de carboxilació (C<sub>c</sub>). La g<sub>m</sub> depèn en bona mesura de l'anatomia foliar interna però també pot respondre ràpidament enfront a variables ambientals degut al transport per aquoporines i altres factors bioquímics (Flexas *et al*, 2013; Bernacchi *et al*, 2002). Si bé els valors de g<sub>m</sub> es troben condicionats parcialment per la g<sub>s</sub>, varien fortament en relació a la història evolutiva de les plantes terrestres; no obstant, hi ha certes baules per omplir referent als valors de g<sub>m</sub> per a certs cormòfits i espermatòfits basals (Flexas *et al*, 2012). Només unes poques espècies de falgueres han estat caracteritzades (Carriquí *et al*, 2014; Gago *et al*, 2013) i no es coneixen els valors de molts grups.



**Figura 1.** Fotografia de microscòpia òptica de la secció d'una fulla de *Nerium oleander*, on es mostren els diferents paràmetres que intervenen en el càlcul de la fotosíntesi (concentracions de CO<sub>2</sub>, conductàncies). Imatge presa i modificada de *Bio 185 Plant Anatomy Lab*. C<sub>a</sub>: concentració de CO<sub>2</sub> ambiental C<sub>i</sub>: concentració de CO<sub>2</sub> a la cavitat subestomàtica C<sub>c</sub>: concentració de CO<sub>2</sub> al lloc de carboxilació de la Rubisco g<sub>s</sub>: conductància estomàtica g<sub>m</sub>: conductància del mesòfil

Una vegada el CO<sub>2</sub> ha difós fins al cloroplast (C<sub>c</sub>), és la maquinària bioquímica la que limita la fotosíntesi. Els components que determinen aquestes limitacions es localitzen a les membranes (tilacoides) del propi cloroplast, l'estroma, els mitocondris i el citosol cel·lular (Sharkey *et al*, 2007). Aquestes limitacions venen en gran part donades per les característiques de l'enzim Rubisco (màxima capacitat de carboxilació, V<sub>c,max</sub>), el transport d'electrons (ETR, J<sub>max</sub>) i altres aspectes relacionats amb les etapes finals de la fotosíntesi (Sharkey *et al*, 2007; Long & Bernacchi, 2003). Per a les plantes basals es disposa de molt poques dades sobre els paràmetres bioquímics, els quals únicament s'han determinat per *Ginkgo biloba* (Overdieck & Strassmeyer, 2004) i recentment per a diverses espècies de falgueres (Gago *et al*, 2013; Carriquí *et al*, 2014).



L'objectiu del present treball fou realitzar un "transsecte" a través de la història evolutiva de les plantes i caracteritzar la fotosíntesi de diverses espècies representatives de diferents grups, incloent els equisets (Sphenophyta), les falgueres (Pteridophyta), les ciques (Cycadophyta), el ginkgo (Ginkgophyta) i les primeres angiospermes (Nymphaeaceae), dels quals es tenen molt poques dades. Mitjançant corbes de resposta al CO<sub>2</sub> variable es determinà en cada espècie els diferents paràmetres que limiten i condicionen la fotosíntesi (A<sub>N</sub>), és a dir, les conductàncies (g<sub>s</sub> i g<sub>m</sub>), l'eficiència en l'ús de l'aigua intrínseca (WUE<sub>i</sub>) i els paràmetres bioquímics (ETR, V<sub>c,max</sub>, J<sub>max</sub>). S'observà la tendència evolutiva en els diferents grups. També fou

objectiu del treball observar les respostes estomàtiques ( $g_s$ ) a la llum i al  $CO_2$  per tal de discernir com ha evolucionat la capacitat de control estomàtic en les plantes.

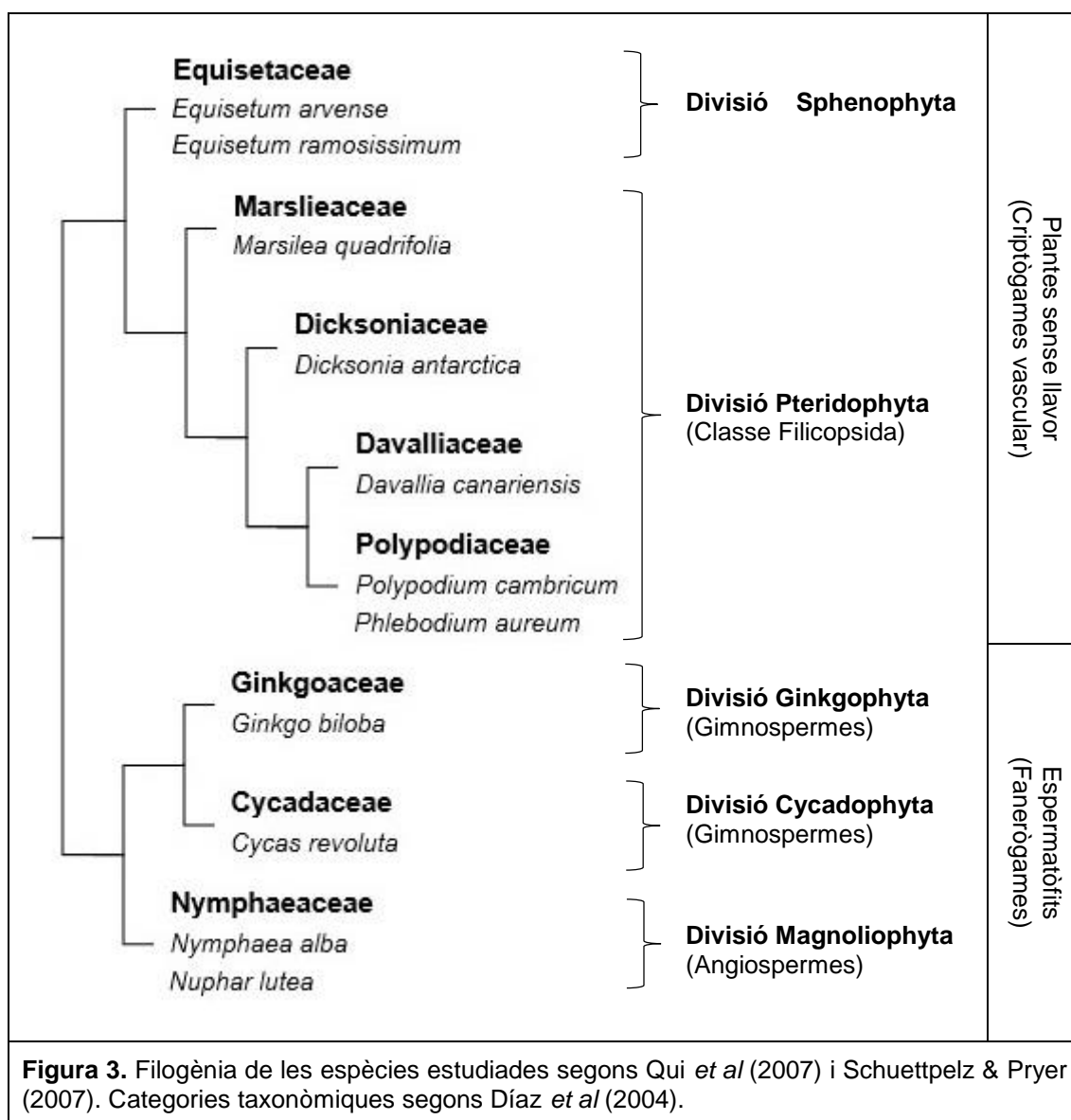
## MATERIAL I MÈTODES

### Plantes estudiades i condicions de creixement

Les plantes utilitzades en l'estudi constitueixen una petita mostra en la història evolutiva; s'han inclòs representants des dels equisets (les espècies més basals) fins a les primeres Angiospermes (les més evolucionades) per a un total de 11 espècies de les divisions Sphenophyta, Pteridophyta, Cycadophyta, Ginkgophyta i Magnoliophyta. A la **Taula 1** es troba el llistat complet d'espècies, juntament amb algunes característiques definitòries. A la **Figura 2** es poden observar les fotografies de les espècies. A la **Figura 3** es mostren les relacions filogenètiques entre les espècies estudiades. El grup amb el major nombre d'espècies disponible és el de les falgueres (Pteridophyta). Aquestes es poden diferenciar en més primitives (*Marsilea quadrifolia* i *Dicksonia antarctica*) i les més evolucionades (ordre Polypodiales, que inclou *Davallia canariensis*, *Polypodium cambricum* i *Phlebodium aureum*) (Smith *et al*, 2006).

			
<i>Equisetum arvense</i>	<i>Equisetum ramosissimum</i>	<i>Marsilea quadrifolia</i>	<i>Dicksonia antarctica</i>
			
<i>Davallia canariensis</i>	<i>Polypodium cambricum</i>	<i>Phlebodium aureum</i>	<i>Ginkgo biloba</i>
			
<i>Cycas revoluta</i>	<i>Nymphaea alba</i>	<i>Nuphar lutea</i>	
<b>Figura 2.</b> Fotografies digitals d'individus de les espècies estudiades.			

S'adquiriren les plantes a partir de vivers de Mallorca a excepció de *Equisetum arvense* que s'adquirí a Galícia (Caíños, P. Do Caramiñal, Coruña) i de *Equisetum ramosissimum*, que s'agafaren exemplars silvestres al Port de Sóller (Mallorca). Per a cada espècie s'obtingueren 4-6 individus per tal de tenir un nombre acceptable de rèpliques. Les plantes cresqueren al Campus de la Universitat de les Illes Balears; durant l'hivern i la primavera es disposaren a l'hivernacle i posteriorment a finals de Maig es situaren a l'exterior. Les plantes es regaren regularment (aproximadament 3 dies a la setmana a capacitat de camp) i les hores de Sol directe foren limitades per evitar condicions d'estrès. Les mesures es dugueren a terme durant el mes de Juliol.





**Taula 1.** Espècies estudiades. Característiques segons HVMO (2007), Anthos (2012), FNA (2008), IUCN Red List (2010) i KRBG (2014).

<b>Espècie</b>	<b>Família</b>	<b>Forma vital</b>	<b>Hàbitat</b>	<b>Fitogeografia</b>
<i>Equisetum arvense</i> L.	Equisetaceae	Geòfit	Llocs ruderalitzats prop de l'aigua	Cosmopolita (Hemisferi Nord)
<i>Equisetum ramosissimum</i> Desf.	Equisetaceae	Geòfit	Terrenys humits i al voltant de cursos d'aigua	Cosmopolita (Ambdós hemisferis)
<i>Marsilea quadrifolia</i> L.	Marsileaceae	Hidròfit	Zones periòdicament inundades	Europa
<i>Dicksonia antarctica</i> Labill.	Dicksoniaceae	Faneròfit	Llocs humits de boscos escleròfils	Austràlia
<i>Davallia canariensis</i> (L.)	Davalliaceae	Epífit	Llocs frescs i humits.	Península Ibèrica, Canàries
<i>Polypodium cambricum</i> L.	Polypodiaceae	Epífit	Parets, murs, soques velles; en llocs ombrívols.	Mediterrània i Europa Occidental
<i>Phlebodium aureum</i> (L.)	Polypodiaceae	Epífit	Bosc tropical i zones humides (pantans)	Amèrica
<i>Ginkgo biloba</i> L.	Ginkgoaceae	Faneròfit	Bosc frondós, sòls humits amb llum abundant	Xino-japonesa
<i>Cycas revoluta</i> Thunberg.	Cycadaceae	Faneròfit	Llocs rocosos i zones ombrívols de boscs oberts	Xino-japonesa
<i>Nymphaea alba</i> L.	Nymphaeaceae	Hidròfit	Aigües dolces estancades o de corrent lenta	Euràsia
<i>Nuphar lutea</i> L.	Nymphaeaceae	Hidròfit	Aigües estancades o de corrent lenta	Cosmopolita (Hemisferi Nord)

## Intercanvi de gasos

Per a les mesures d'intercanvi de gasos i fluorescència s'emprà un aparell Li-cor (Li-6400XT) constituït per un sistema d'anàlisi de gasos d'infraroig (IRGAs) de circuit tancat i una càmera de mesura de la fluorescència de la clorofil·la acoblada (6400-40, LI-COR Biosciences; Li-cor, Inc.) A la **Figura 4** s'observa l'aparell.

Les mesures d'intercanvi de gasos consistiren en la realització de corbes de resposta de la fotosíntesis neta ( $A_N$ ) a la llum i corbes de resposta al  $\text{CO}_2$  ambiental. A més, es mesuraren els diferents paràmetres fisiològics com la taxa de fotosíntesi neta ( $A_N$ ), la conductància estomàtica ( $g_s$ ) i la concentració subestomàtica de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), així com la temperatura de la fulla, en les condicions següents:  $1500 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (densitat del flux fotònic fotosintètic o PPFD, amb un component del 10% de llum blava),  $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  (concentració atmosfèrica de  $\text{CO}_2$ ,  $C_a$ ), temperatura del bloc de  $25^\circ\text{C}$  i flux d'aire a  $100 \mu\text{mol s}^{-1}$ ; les mesures es realitzaren a un flux baix per a garantir una major precisió en la mesura (Gago *et al*, 2013). Totes les mesures es realitzaren a humitat ambiental (40-70% humitat relativa). Es seleccionaren fulles completament desenvolupades per a prendre les dades. Una vegada pinçada la fulla, s'esperaren uns 10-15 min per a la seva estabilització, tant a l'hora de prendre les mesures estàndard a les condicions esmentades com a l'hora de començar les corbes. L'espècie *Nuphar lutea* presenta dos tipus de fulles, aèries i submergides (Snir *et al*, 2006); per a aquest estudi es mesuraren fulles aèries.



**Figura 4.** Presa de dades amb el Li-cor 6400 (incloent la càmera de fluorescència 6400-40) a un individu de *Cycas revoluta*.

Es realitzaren 3 corbes de resposta a la llum (Tambussi & Graciano, 2010) per a cada espècie, cada una en un individu diferent. Les corbes comprenen un total de 14 mesures de PPFD diferents, des de  $2000 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fins a  $0 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . En tot moment la  $C_a$  es mantingué a  $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ . El temps entre cada un dels punts per a l'estabilització de la mostra fou de 2-3 min. Per a les corbes de resposta al  $\text{CO}_2$  o corbes  $A/C_i$  (Tambussi & Graciano, 2010; Long & Bernacchi, 2003), es mantingué una llum saturant de  $1500 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  excepte per a *Nymphaea alba*, en que fou de  $700 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (també saturant). Es realitzà una corba de  $\text{CO}_2$  a cada individu de cada espècie per a un total de 4-6 corbes segons el nombre d'individus disponible. La majoria de corbes comprenen dues parts: una de resposta al baix  $\text{CO}_2$  ( $C_a < 400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ) i una de resposta a una concentració elevada ( $C_a > 400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ). La primera part consistia en 7 mesures amb una concentració des de 400 fins

a  $0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  i posteriorment 6 mesures des de 400 fins a  $2000 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ . Algunes espècies (*Cycas revoluta*, *Equisetum ramosissimum* i *Marsilea quadrifolia*), no obstant, no responien adequadament a aquesta distribució de les diferents concentracions (els valors de la corba A/C<sub>i</sub> no eren precisos) i els punts foren redistribuïts des de 2000 fins a  $0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ . En tots els casos el temps entre cada un dels punts per a l'estabilització de la mostra fou de 3-4 min.

Per tal de corregir les possibles fugues degudes a les grans diferències entre la concentració de CO<sub>2</sub> fora i la de dins la càmera es realitzà una corba de resposta al CO<sub>2</sub> addicional per a cada espècie però mesurant una fulla morta, ja que la morfologia foliar de cada espècie pot provocar certes interferències i alterar el valor real d'intercanvi de gasos (Long & Bernacchi, 2003; Flexas *et al*, 2007). Es seleccionà una fulla i s'introduí dins aigua bullent uns 1-2 min per matar tot el teixit; per tal d'assegurar-se de que la fulla estàs completament morta es realitzà una mesura per fluorescència de la taxa de transport d'electrons al fotosistema II (ETR), comprovant-se que la ETR fos zero (assegurant així una nul·la activitat fotosintètica). Un cop feta la comprovació, es realitzà una corba de resposta al CO<sub>2</sub> en les mateixes condicions i s'aplicà la correcció a les corbes A/C<sub>i</sub> seguint la metodologia descrita per Flexas *et al* (2007). També es corregiren els valors de fotosíntesi en condicions estàndard.

La càmera on es situa la mostra té una superfície de 2 cm<sup>2</sup>; les fulles de certes espècies cobreixen perfectament aquesta superfície (*Polypodium cambricum*, *Ginkgo biloba*, *Phlebodium aureum* i ambdós nenúfars). No obstant, la resta presenten una morfologia foliar particular i és necessari corregir l'àrea (Gago *et al*, 2013). Aquest és el cas de *Dicksonia antarctica*, *Davallia canariensis* i *Marsilea quadrifolia*. Així, es corregí l'àrea fent una fotografia de la fulla analitzada i recalculant l'àrea realment exposada mitjançant el programa ImageJ (National Institutes of Health, EEUU). En el cas de *Cycas revoluta*, *Equisetum arvense* i *E. ramosissimum*, la morfologia de la fulla (o tija, en el cas dels equisets) dificulta l'ús de la càmera de l'aparell ja que no es pot tancar apropiadament. Per això, es recobriren les gomes que tanquen la càmera amb massilla adhesiva (Blutack, Bostik, S.A., Espanya) per a garantir un tancament hermètic, sent aquesta una tècnica no invasiva (**Figura 5**). Posteriorment a la presa de dades, també es recalculà l'àrea mitjançant la metodologia ja descrita. També s'utilitzà la massilla en la mesura de fugues en les mateixes espècies que ho requerien.



**Figura 5.** Imatge de folíols de *Cycas revoluta* coberts amb massilla, preparats per a ser mesurats.

A banda de les corbes, també es mesurà la respiració mitocondrial en obscuritat ( $R_n$ ) de cada un dels individus de totes les espècies. Per fer-ho, es deixaren les plantes tota una nit en una habitació a les fosques i posteriorment es mesurà la respiració en les condicions estàndard (excepte pel fet de no exposar la mostra a la llum:  $0 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de PPFD) (Gago *et al*,

2013; Varela *et al* 2010). Una vegada estabilitzada, es mesurà la fulla prenent valors cada 20 s durant 5 min (6-7 valors per mostra). Posteriorment, es calculà la respiració en la llum ( $R_d$ ) com a la meitat de  $R_n$  (Gago *et al*, 2013).

La càmera d'anàlisi de gasos no diferencia entre la conductància cuticular i estomàtica; assumint de fet que tota és exclusivament estomàtica,  $g_s$ . No obstant, també hi ha un component de la transpiració mesurada que correspon a la conductància cuticular ( $g_c$ ) la qual pot induir errades en el càlcul de la  $C_i$  (Boyer *et al*, 1997). Per tal de corregir la  $g_s$ , es mesurà la  $g_c$  seguint el mètode de Gago *et al* (2013). En primer lloc, cal determinar si la fulla és amfistomàtica o no observant-la al microscopi òptic per comprovar la presència i distribució dels estomes. Si la fulla només presenta estomes en una de les cares (hipostomàtica o epistomàtica) llavors es pot cobrir la cara amb estomes per tal de mesurar únicament la conductància cuticular (la meitat del seu valor total). De les espècies estudiades, totes resultaren ser hipostomàtiques tret dels nenúfars, que degut a la seva adaptació a l'ambient aquàtic tenen una disposició estomàtica particular: *Nymphaea alba* és epistomàtica mentre que *Nuphar lutea* és amfistomàtic (estomes a les dues cares de la fulla). Degut a que aquesta tècnica no és aplicable a espècies amfistomàtiques, per a *Nuphar lutea* es prengué el valor mesurat de *Nymphaea alba*, degut a que pertanyen a la mateixa família i presenten unes característiques foliars similars (LMA semblant, veure resultats). Es tapà la cara amb estomes amb grassa de silicona i un plàstic fi, a fi d'evitar la transpiració estomàtica. Es prengueren mesures de tots els individus cada 20 s durant 5 min en les condicions estàndard (400  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ , 1500  $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , 25°C, flux de 100  $\mu\text{mol s}^{-1}$ ). Degut a la morfologia dels equisets no es va poder mesurar la conductància cuticular i la seva  $g_s$  no està corregida per la  $g_c$ .

### Resposta estomàtica

A banda de representar les corbes de resposta estomàtica, també es determinà la resposta estomàtica estàndard absoluta i relativa per a totes les espècies en resposta tant a la irradiància com al baix i elevat  $\text{CO}_2$ . La resposta estàndard consisteix en mesurar el grau de variació d'un paràmetre ( $g_s$ ) entre dos punts, que en aquest cas foren 0 i 1500  $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  per a PFD, 0 i 400  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  per al baix  $\text{CO}_2$  i 400 i 2000  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  per a l'elevat  $\text{CO}_2$ . Les fórmules utilitzades per al càlcul són les següents (Creese *et al*, 2014):

$$\text{Resp. Est. Abs.} = g_{s \text{ punt } 1} - g_{s \text{ punt } 2}$$

$$\text{Resp. Est. Rel.} = (g_{s \text{ punt } 1} - g_{s \text{ punt } 2}) / g_{s \text{ punt } 1}$$

### Fluorescència

Les mesures de fluorescència es realitzaren simultàniament a les corbes gràcies a la càmera de fluorescència 6400-40 (Figura 4), que permet mesurar directament els següents paràmetres:  $F_o$ ,  $F_m$ ,  $F$ ,  $F_s$ ,  $F_m'$  i  $F_o'$ . A partir d'aquests es pot calcular la taxa de transport d'electrons (ETR) i les eficiències quàntiques del fotosistema II (PSII), entre d'altres (LI-COR Biosciences, Li-cor, Inc.; Harbinson *et al*, 1989; Flexas *et al*, 2007). A partir de les mesures de la fluorescència en estat estable ( $F_s$ ) i la fluorescència màxima durant l'aplicació d'un pols de llum saturant ( $F_m'$ ) (Genty *et al*, 1989) es pot calcular l'eficiència quàntica del PSII ( $\phi_{PSII}$ ) i la ETR mitjançant les fórmules següents (Gago *et al*, 2013; Flexas *et al*, 2007):

$$\phi_{PSII} = (F_s - F_m') / F_m'$$

$$\text{ETR} = \phi_{PSII} \cdot \text{PPFD} \cdot \alpha \cdot \beta$$

On  $\alpha$  correspon a l'absorbància foliar i  $\beta$  és el coeficient de partició quàntic entre PSI i PSII. Per a calcular el producte  $\alpha \cdot \beta$  s'emprà el mètode descrit per Valentini *et al* (1995) basat en la relació lineal entre  $\phi_{PSII}$  i  $\phi_{CO_2}$  ( $\phi_{CO_2} = [A_n + R_d] / \text{PPFD}$ ; Flexas *et al*, 2007) en condicions de baix  $\text{O}_2$  (és a dir, absència de fotorespiració), aconseguit utilitzant aire a partir d'una botella de nitrogen pur (BIP Technology) al qual s'hi afegí  $\text{CO}_2$  i vapor d'aigua (per a mantenir un 40-70% d'humitat relativa). Es realitzaren 3 corbes de resposta a la llum per espècie (3 individus diferents) en les mateixes condicions que les anteriorment descrites exceptuant pel baix  $\text{O}_2$ . Per a

determinar la relació entre  $\phi_{PSII}$  i  $\phi_{CO_2}$  i calcular  $\alpha \cdot \beta$  es realitzaren els càlculs descrits per Long & Bernacchi (2003) i Flexas *et al* (2007).

### Estimacions de paràmetres fisiològics ( $g_m$ , $V_{c,max}$ , $J_{max}$ )

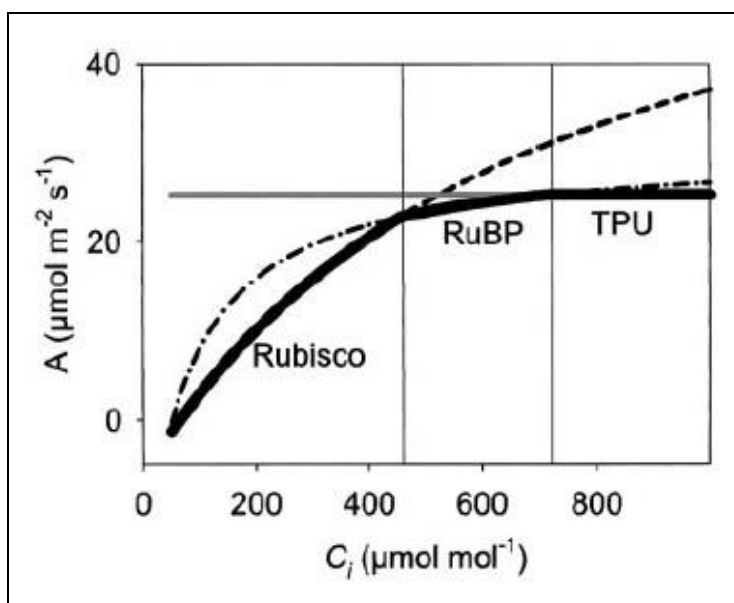
Les estimacions de la conductància del mesòfil ( $g_m$ ) es feren utilitzant el model de Harley (Harley *et al*, 1992; Long & Bernacchi, 2003), que requereix mesures d'intercanvi de gasos ( $A$ ,  $R_d$ ) i fluorescència (ETR). L'equació utilitzada és la següent:

$$g_m = A / [C_i - \Gamma^* (J + 8A + 8R_d) / (J - 4A - 4R_d)]$$

On  $\Gamma^*$  correspon al punt de compensació del  $CO_2$  en absència de respiració en obscuritat i  $J$  equival a la ETR. Totes les variables de l'equació foren determinades experimentalment a excepció de  $\Gamma^*$ , per al qual s'utilitzà el valor promig dels cormòfits determinat per Bauer & Martha (1981) per a les falgueres i equisets, valor que coincideix amb el descrit per Gago *et al* (2013) calculat a partir del factor específic de la Rubisco de tres espècies de falgueres. Per als espermatòfits s'emprà el valor aproximat de  $40 \mu\text{mol } CO_2 \text{ mol}^{-1} \text{ aire}$ , determinat per a les diferents famílies estudiades (Krenzer Jr *et al*, 1975). Es calcularen els valors de  $g_m$  tant en condicions estàndard com per a cada punt de les corbes  $A/C_i$  per tal d'observar les variacions de  $g_m$  en funció de les diferents concentracions de  $CO_2$  (Flexas *et al*, 2007). Una vegada obtingut el valor de  $g_m$  es pogué calcular la  $C_c$  aplicant la fórmula de la Primera Llei de Fick:

$$A = g_m (C_i - C_c)$$

Els paràmetres bioquímics s'obtingueren mitjançant dos procediments: el model descrit per Farquhar (Farquhar *et al*, 1980; Long & Bernacchi, 2003) i el de Sharkey (Sharkey *et al*, 2007) per a les plantes amb metabolisme del tipus  $C_3$ . Ambdós models calculen  $V_{c,max}$ ,  $J_{max}$  i TPU a partir de diferents seccions de les corbes  $A/C_c$  (Farquhar; requerint per tant el càlcul independent de  $g_m$ ) i  $A/C_i$  (Sharkey). Aquests models associen cada paràmetre a una fase de la corba, assumint que a mesura que augmenta la concentració de  $CO_2$  la fotosíntesi es veu limitada per un factor diferent (Sharkey *et al*, 2007). A la **Figura 6** s'observa una corba  $A/C_i$  idealitzada i les diferents fases.



**Figura 6.** Corba  $A/C_i$  idealitzada on es mostren les tres fases que limiten la resposta de  $A$  (línia més gruixuda). Imatge presa de Long & Bernacchi (2003).

En la primera fase ([CO<sub>2</sub>] menor) el factor limitant és la Rubisco i es calcula la taxa màxima de carboxilació (V<sub>c,max</sub>). En la segona fase la Rubisco ja actua a velocitat màxima i el factor limitant és la regeneració de RuBP; en aquesta fase es calcula la taxa màxima de transport d'electrons (J<sub>max</sub>). Finalment, la tercera fase correspon a la saturació de la capacitat fotosintètica (A<sub>N</sub> ja no augmenta encara que augmenti la concentració de CO<sub>2</sub>) i permet calcular la limitació per ús de trioses fosfat (TPU), els productes de la fotosíntesi. Degut a que en alguns casos la temperatura de la fulla superava els 30°C i hi havia variabilitat en la temperatura entre espècies, es referenciaren els resultats dels paràmetres bioquímics a una temperatura estàndard de 25°C utilitzant el mètode descrit a Sharkey *et al* (2007).

### Anàlisi de les limitacions fotosintètiques

Es quantificaren les limitacions fotosintètiques seguint el mètode descrit a Grassi & Magnani (2005). S'utilitzaren els valors de g<sub>s</sub>, g<sub>m</sub> i V<sub>c,max</sub> per a determinar les limitacions relatives imposades per la conductància estomàtica (I<sub>s</sub>), la del mesòfil (I<sub>m</sub>) i bioquímiques (I<sub>b</sub>), respectivament. S'emprà únicament V<sub>c,max</sub> com a limitació bioquímica ja que era el factor limitant a la fotosíntesi en les condicions de CO<sub>2</sub> mesurades (veure corbes A/C<sub>i</sub> a l'apartat de resultats) (Gago *et al*, 2013). Les fórmules utilitzades per al càlcul foren les següents (Grassi & Magnani, 2005):

$$I_s = (g_{tot} / g_s \cdot \delta A / \delta C_c) / (g_{tot} + \delta A / \delta C_c) \quad I_m = (g_{tot} / g_m \cdot \delta A / \delta C_c) / (g_{tot} + \delta A / \delta C_c)$$

$$I_b = g_{tot} / (g_{tot} + \delta A / \delta C_c) \quad g_{tot} = 1 / g_s + 1 / g_m$$

### Característiques foliars

Per a caracteritzar la fulla es mesuraren el pes sec, el pes turgent i el pes fresc per a poder obtenir els següents paràmetres: massa foliar per àrea (LMA), contingut hídric relatiu (RWC) i contingut de massa seca de la fulla (LDMC) (Cornelissen *et al*, 2003). A continuació es mostren les fórmules utilitzades per a cada un dels paràmetres:

$$LMA = PS (g) / AF (m^2)$$

$$RWC = PF - PS / PT - PS$$

$$LDMC = PS (mg) / PT (g)$$

On AF correspon a l'àrea foliar, PS al pes sec, PF al pes fresc i PT al pes turgent. Es mesuraren 6 mostres d'àrea coneguda per espècie (en ser possible d'individus diferents) a partir de fulles ja desenvolupades. Just en obtenir les mostres es mesuraren en una balança de precisió HM-202 (e=1mg, d=0,01/0,1mg; AND) per a obtenir el pes fresc. Posteriorment, s'introduïren dins tubs Eppendorf amb aigua destil·lada i romangueren 2-3 dies a la nevera per obtenir el pes turgent. Finalment, les mateixes mostres es posaren en una estufa al voltant de 60°C durant 3-4 dies per a mesurar el pes sec (Cornelissen *et al*, 2003).

### Anàlisi estadístic

Per a l'anàlisi estadístic dels diferents paràmetres mesurats es realitzaren tests de Duncan de comparació múltiple amb un nivell P < 0,05 (interval de confiança del 95%) per a determinar diferències significatives. També es realitzaren entre els diferents punts de les corbes per a determinar diferències dins les corbes de cada espècie. Per a les correlacions entre paràmetres s'utilitzà el test de correlació de Pearson amb un nivell P < 0,001. L'anàlisi s'executà mitjançant el paquet de software estadístic SPSS IBM 16.0 (SPSS, Chicago, IL, EEUU).

## RESULTATS

A la **Taula 2** es mostren les característiques foliars de les diferents espècies. El rang de LMA, la característica bàsica més significativa, varia àmpliament entre les espècies. Els valors més baixos corresponen a les falgueres (mitjana de 51,9 g m<sup>-2</sup>) i als nenúfars (mitjana de 27,0 g m<sup>-2</sup>). Dins les falgueres destaca *Marsilea quadrifolia* pel seu valor extremadament baix (17,7 g m<sup>-2</sup>). Els equisets presenten un LMA promig de 106,1 g m<sup>-2</sup>, encara que el valor de les dues espècies és significativament diferent (veure taula). Entre *Ginkgo biloba* i *Cycas revoluta* el valor també és diferent, sent aquesta darrera espècie la que presenta una major LMA (251,6 g m<sup>-2</sup>). El LDMC, relacionat amb el grau de duresa de la fulla, es correlaciona generalment amb LMA (Cornelissen *et al*, 2003).

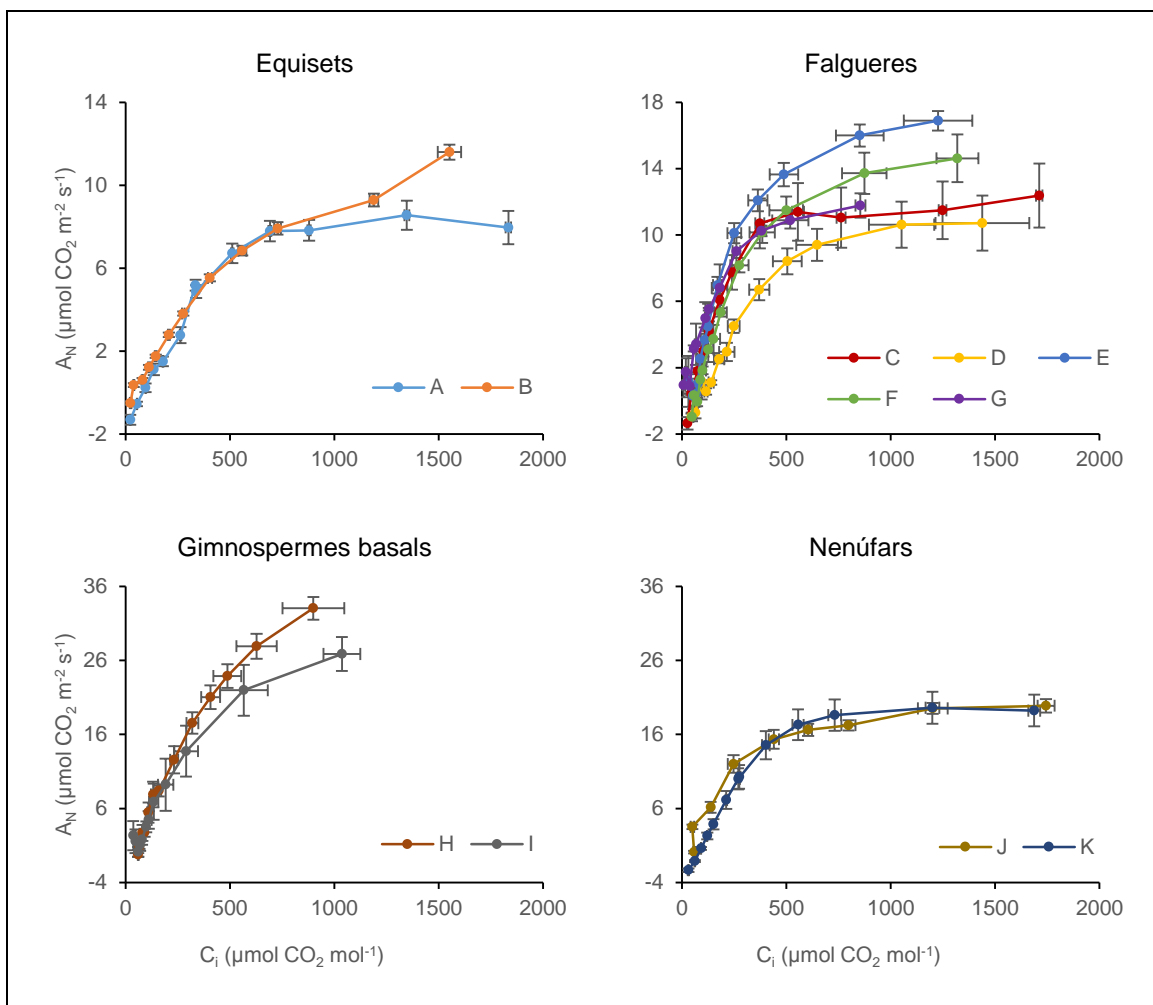
**Taula 2.** Característiques foliars: massa foliar per àrea (LMA), àrea específica de la fulla (SLA), contingut hídic relatiu (RWC) i contingut de massa seca de la fulla (LDMC). Els valors corresponen a les mitjanes i errors estàndard de sis rèpliques per espècie. Les lletres indiquen similituds i/o diferències significatives ( $P < 0,05$ ) segons el test de Duncan.

Espècie	LMA (g m <sup>-2</sup> )	RWC	LDMC (mg g <sup>-1</sup> )
<i>Equisetum arvense</i>	83,2 ± 8,8 <sup>d</sup>	0,70 ± 0,02 <sup>bcd</sup>	185,2 ± 17,2 <sup>d</sup>
<i>Equisetum ramosissimum</i>	129,0 ± 11,6 <sup>e</sup>	0,72 ± 0,04 <sup>cd</sup>	117,2 ± 10,4 <sup>ab</sup>
<i>Marsilea quadrifolia</i>	17,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,04 <sup>e</sup>	135,5 ± 9,4 <sup>bc</sup>
<i>Dicksonia antarctica</i>	71,8 ± 2,9 <sup>d</sup>	0,90 ± 0,01 <sup>f</sup>	346,2 ± 15,2 <sup>g</sup>
<i>Davallia canariensis</i>	46,7 ± 4,6 <sup>c</sup>	0,68 ± 0,04 <sup>bcd</sup>	219,5 ± 14,2 <sup>e</sup>
<i>Polypodium cambricum</i>	42,1 ± 1,0 <sup>bc</sup>	0,63 ± 0,02 <sup>b</sup>	153,3 ± 6,0 <sup>cd</sup>
<i>Phlebodium aureum</i>	81,5 ± 5,4 <sup>d</sup>	0,82 ± 0,02 <sup>e</sup>	278,1 ± 10,2 <sup>f</sup>
<i>Ginkgo biloba</i>	85,1 ± 3,6 <sup>d</sup>	0,83 ± 0,02 <sup>e</sup>	261,6 ± 11,1 <sup>f</sup>
<i>Cycas revoluta</i>	251,6 ± 11,5 <sup>f</sup>	0,67 ± 0,02 <sup>bc</sup>	353,7 ± 13,6 <sup>g</sup>
<i>Nymphaea alba</i>	30,0 ± 1,0 <sup>abc</sup>	0,53 ± 0,01 <sup>a</sup>	100,1 ± 3,6 <sup>a</sup>
<i>Nuphar lutea</i>	23,9 ± 1,7 <sup>ab</sup>	0,76 ± 0,01 <sup>de</sup>	103,0 ± 4,5 <sup>ab</sup>

A la **Figura 7** es mostren les corbes A/C<sub>i</sub> mesurades. Encara que algunes han saturat completament (*Equisetum ramosissimum*, *Marsilea quadrifolia*, *Dicksonia antarctica*, els dos nenúfars) altres no ho han fet i per tant el càlcul de TPU no ha estat possible, si bé les dues fases prèvies sí han quedat perfectament definides en la gran majoria de casos i s'han pogut realitzar els càlculs apropiats.

La **Taula 3** presenta totes les característiques fotosintètiques de les espècies. Els valors de V<sub>c,max</sub> i J<sub>max</sub> que es presenten han estat calculats mitjançant el model de Farquhar i la g<sub>m</sub> calculada seguint el model de Harley. Es mostren només aquests valors dels paràmetres bioquímics ja que els calculats mitjançant el mètode de Sharkey presentaven una aproximació inexacta de g<sub>m</sub> en molts dels casos i no s'arribava a un nombre significatiu de rèpliques per espècie (cal recordar que aquest model extreu els resultats a partir de la corba A/C<sub>i</sub>, sense requerir un valor independent de g<sub>m</sub>). Referent a la fotosíntesi (A<sub>N</sub>) s'observa com els valors augmenten a través dels diferents grups: la mitjana per a les dues espècies d'equisets és 4,39 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; per a les falgueres, 5,88 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (sense haver diferències significatives amb els equisets segons el test de Duncan,  $P < 0,005$ ); per a les gimnospermes basals, 8,85 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> i per als nenúfars, 11,13 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Cal destacar *Marsilea quadrifolia*,

que presenta un valor similar a les Fanerògames. La  $g_s$  i la  $WUE_i$ , en canvi, no segueixen una tendència evolutiva tan clara. La mitjana de  $g_s$  per als equisets és de  $0,069 \text{ mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (si bé el valor de *E. arvense* és molt elevat); la de les falgueres,  $0,037 \text{ mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (el valor de *M. quadrifolia* és significativament major que la resta); la de les gimnospermes,  $0,042 \text{ mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (sense presentar diferències significatives amb les falgueres); i la dels nenúfars és la més elevada:  $0,116 \text{ mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Respecte al  $WUE_i$ , tant les gimnospermes com les falgueres mostren una major eficiència respecte als altres dos grups, sent les primeres les que presenten un valor promig més elevat ( $121,1 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Tanmateix, l'espècie amb el major  $WUE_i$  és la falguera *Phlebodium aureum*. El valor més petit de  $g_m$  correspon al equisets ( $0,024 \text{ mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), significativament menor que la resta; els valors de les falgueres i els nenúfars no presenten diferències significatives ( $0,068$  i  $0,094 \text{ mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivament), no obstant algunes espècies com *P. aureum* i *Nuphar lutea* mostren uns valors significativament més elevats. Les gimnospermes són el grup amb la  $g_m$  més elevada ( $0,151 \text{ mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). La ETR, una vegada corregida mitjançant les corbes de baix oxigen, presenta diferències significatives entre els quatre grups: el valor més baix correspon als equisets ( $55,0 \mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), les falgueres i nenúfars presenten uns valors intermedis ( $67,7$  i  $88,3 \mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivament)



**Figura 7.** Corbes  $A/C_i$  de cada una de les espècies en les condicions següents: PPFD saturant ( $>700 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), temperatura del bloc a  $25^\circ\text{C}$ , flux de  $100 \mu\text{mol s}^{-1}$  i humitat ambiental (40-70%). Cada un dels punts representa la mitjana de 4-6 rèpliques; les barres d'error corresponen a l'error estàndard. A: *Equisetum arvense* B: *Equisetum ramosissimum* C: *Marsilea quadrifolia* D: *Dicksonia antarctica* E: *Davallia canariensis* F: *Polypodium cambricum* G: *Phlebodium aureum* H: *Ginkgo biloba* I: *Cycas revoluta* J: *Nymphaea alba* K: *Nuphar lutea*

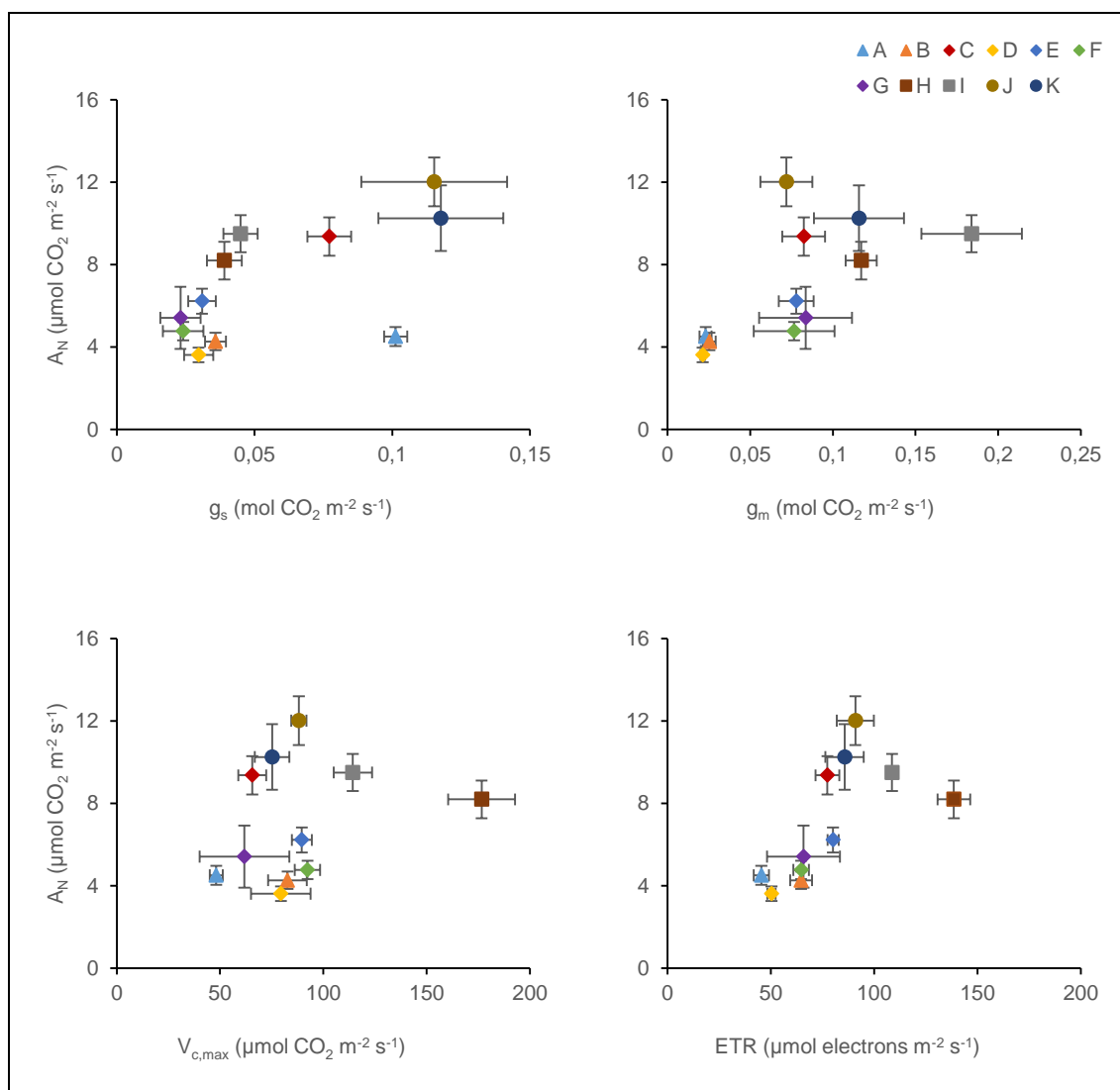


**Taula 3.** Característiques fotosintètiques de les espècies estudiades. Els valors corresponen a les mitjanes i errors estàndard de quatre a sis rèpliques per espècie. Les dades foren preses en les següents condicions: PPF saturant (>700  $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $C_a$  de 400  $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ , temperatura del bloc a 25°C, flux de 100  $\mu\text{mol s}^{-1}$  i humitat ambient (40-70%). El valor d'ETR està corregit mitjançant les corbes de baix  $O_2$ . Els valors de  $V_{c,max}$  i  $J_{max}$  han estat calculats mitjançant el model de Farquhar (Farquhar *et al*, 1980) i corregits per a una temperatura de 25°C (Sharkey *et al*). Les lletres indiquen similituds i/o diferències significatives ( $P < 0,05$ ) segons el test de Duncan.

Espècie	$A_N$ ( $\mu\text{mol CO}_2$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$R_d$ ( $\mu\text{mol CO}_2$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$g_s$ ( $\text{mol CO}_2$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$g_c$ ( $\text{mmol H}_2\text{O}$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$g_m$ Harley ( $\text{mol H}_2\text{O}$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$WUE_i$ ( $\mu\text{mol CO}_2$ $\text{mol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	ETR ( $\mu\text{mol e}^-$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$V_{c,max}$ ( $\mu\text{mol CO}_2$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$J_{max}$ ( $\mu\text{mol e}^-$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$C_i$ ( $\mu\text{mol CO}_2$ $\text{mol}^{-1}$ )	$C_c$ Harley ( $\mu\text{mol CO}_2$ $\text{mol}^{-1}$ )
<i>Equisetum arvense</i>	4,51 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>	0,96 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	0,101 $\pm$ 0,004 <sup>c</sup>	No mesurada	0,023 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	27,5 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	45,4 $\pm$ 3,7 <sup>a</sup>	48,1 $\pm$ 3,2 <sup>a</sup>	45,8 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	342,4 $\pm$ 4,3 <sup>c</sup>	140,1 $\pm$ 11,0 <sup>b</sup>
<i>Equisetum ramosissimum</i>	4,27 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>	1,05 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,036 $\pm$ 0,004 <sup>ab</sup>	No mesurada	0,025 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	74,8 $\pm$ 4,4 <sup>bc</sup>	64,7 $\pm$ 5,4 <sup>ab</sup>	82,7 $\pm$ 9,4 <sup>bc</sup>	65,0 $\pm$ 6,5 <sup>abc</sup>	264,4 $\pm$ 7,4 <sup>b</sup>	91,5 $\pm$ 7,3 <sup>a</sup>
<i>Marsilea quadrifolia</i>	9,36 $\pm$ 0,93 <sup>cde</sup>	0,46 $\pm$ 0,04 <sup>bc</sup>	0,077 $\pm$ 0,008 <sup>bc</sup>	10,4 $\pm$ 3,8 <sup>ab</sup>	0,082 $\pm$ 0,013 <sup>ab</sup>	69,3 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>	77,4 $\pm$ 5,8 <sup>bc</sup>	65,6 $\pm$ 5,5 <sup>ab</sup>	53,5 $\pm$ 3,2 <sup>ab</sup>	249,2 $\pm$ 4,9 <sup>b</sup>	136,9 $\pm$ 4,3 <sup>b</sup>
<i>Dicksonia antarctica</i>	3,62 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	0,32 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	0,030 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	7,6 $\pm$ 2,3 <sup>ab</sup>	0,021 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	67,3 $\pm$ 4,5 <sup>b</sup>	50,3 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>	79,5 $\pm$ 14,4 <sup>ab</sup>	76,8 $\pm$ 15,0 <sup>cd</sup>	255,0 $\pm$ 12,0 <sup>b</sup>	86,0 $\pm$ 5,1 <sup>a</sup>
<i>Davallia canariensis</i>	6,23 $\pm$ 0,61 <sup>ab</sup>	0,45 $\pm$ 0,08 <sup>bc</sup>	0,031 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	11,7 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>	0,078 $\pm$ 0,012 <sup>ab</sup>	103,8 $\pm$ 5,4 <sup>cd</sup>	80,1 $\pm$ 2,7 <sup>bc</sup>	89,6 $\pm$ 4,9 <sup>bc</sup>	91,3 $\pm$ 1,5 <sup>de</sup>	184,5 $\pm$ 8,7 <sup>a</sup>	95,8 $\pm$ 5,2 <sup>a</sup>
<i>Polypodium cambricum</i>	4,77 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>	0,35 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	0,024 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup>	12,2 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	0,077 $\pm$ 0,024 <sup>ab</sup>	109,7 $\pm$ 16,2 <sup>d</sup>	64,7 $\pm$ 3,8 <sup>ab</sup>	92,3 $\pm$ 6,1 <sup>bc</sup>	71,6 $\pm$ 9,4 <sup>bcd</sup>	184,8 $\pm$ 30,3 <sup>a</sup>	84,0 $\pm$ 5,1 <sup>a</sup>
<i>Phlebodium aureum</i>	6,66 $\pm$ 0,66 <sup>abc</sup>	0,39 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>	0,027 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup>	5,2 $\pm$ 0,5 <sup>ab</sup>	0,103 $\pm$ 0,020 <sup>b</sup>	151,3 $\pm$ 29,7 <sup>e</sup>	81,3 $\pm$ 3,4 <sup>bc</sup>	80,3 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>	93,0 $\pm$ 5,6 <sup>de</sup>	158,1 $\pm$ 29,8 <sup>a</sup>	88,2 $\pm$ 5,9 <sup>a</sup>
<i>Ginkgo biloba</i>	8,20 $\pm$ 0,92 <sup>bcd</sup>	0,57 $\pm$ 0,07 <sup>bc</sup>	0,039 $\pm$ 0,006 <sup>ab</sup>	3,7 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	0,117 $\pm$ 0,009 <sup>b</sup>	127,1 $\pm$ 7,0 <sup>de</sup>	138,6 $\pm$ 7,9 <sup>e</sup>	176,6 $\pm$ 16,2 <sup>d</sup>	144,3 $\pm$ 4,2 <sup>g</sup>	153,7 $\pm$ 13,3 <sup>a</sup>	82,6 $\pm$ 7,0 <sup>a</sup>
<i>Cycas revoluta</i>	9,50 $\pm$ 0,90 <sup>cde</sup>	0,44 $\pm$ 0,10 <sup>bc</sup>	0,045 $\pm$ 0,006 <sup>ab</sup>	11,2 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	0,184 $\pm$ 0,030 <sup>c</sup>	115,2 $\pm$ 3,7 <sup>d</sup>	108,7 $\pm$ 2,2 <sup>d</sup>	114,2 $\pm$ 9,3 <sup>c</sup>	116,5 $\pm$ 5,5 <sup>f</sup>	157,9 $\pm$ 9,6 <sup>a</sup>	101,2 $\pm$ 6,2 <sup>a</sup>
<i>Nymphaea alba</i>	12,02 $\pm$ 1,19 <sup>e</sup>	0,67 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	0,115 $\pm$ 0,026 <sup>c</sup>	26,2 $\pm$ 3,1 <sup>c</sup>	0,072 $\pm$ 0,016 <sup>ab</sup>	62,8 $\pm$ 11,7 <sup>b</sup>	90,9 $\pm$ 8,9 <sup>c</sup>	88,1 $\pm$ 3,6 <sup>bc</sup>	110,8 $\pm$ 2,7 <sup>ef</sup>	247,1 $\pm$ 27,3 <sup>b</sup>	140,8 $\pm$ 11,8 <sup>b</sup>
<i>Nuphar lutea</i>	10,25 $\pm$ 1,59 <sup>de</sup>	0,98 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,118 $\pm$ 0,023 <sup>c</sup>	26,2 $\pm$ 3,1 <sup>c</sup>	0,116 $\pm$ 0,027 <sup>b</sup>	48,1 $\pm$ 2,3 <sup>ab</sup>	85,7 $\pm$ 9,3 <sup>c</sup>	75,2 $\pm$ 8,4 <sup>ab</sup>	77,6 $\pm$ 7,3 <sup>cd</sup>	274,0 $\pm$ 6,8 <sup>b</sup>	174,0 $\pm$ 15,2 <sup>c</sup>

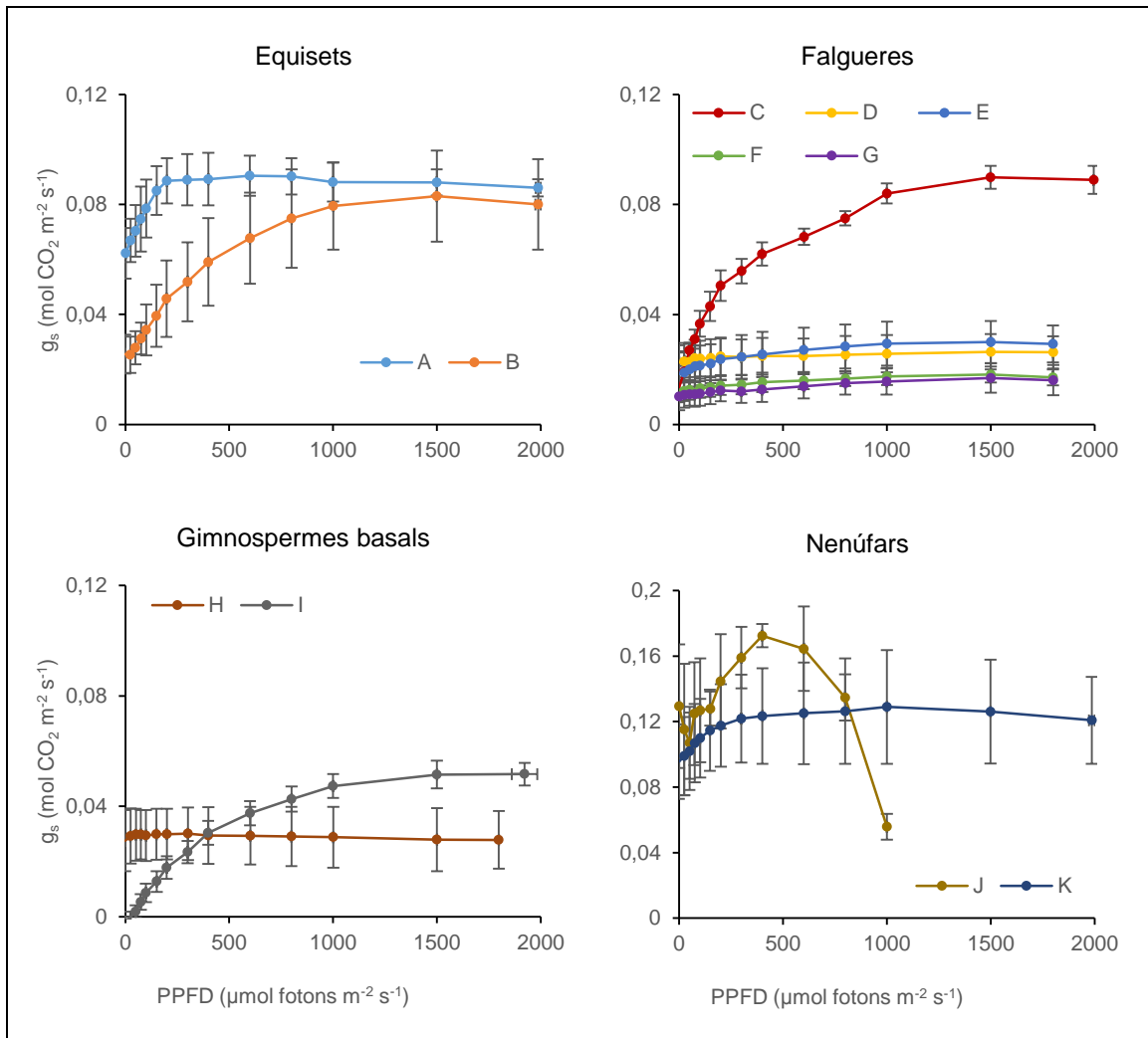
i les gimnospermes, el valor més elevat ( $123,6 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Els valors de  $V_{c,\text{max}}$  dels equisets ( $65,4 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), falgueres ( $77,7 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) i nenúfars ( $81,7 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) no presenten diferències significatives entre les mitjanes dels diferents grups, mentre que les gimnospermes sí són diferents (mitjana més elevada,  $145,4 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Els valors de  $J_{\text{max}}$  difereixen una mica més entre els grups: la  $J_{\text{max}}$  dels equisets és la significativament més baixa ( $55,4 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); no hi ha diferències significatives entre les falgueres ( $73,0 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) i els nenúfars ( $81,7 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); les gimnospermes són les que presenten els valors més elevats ( $145,4 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), igual que per a la  $V_{c,\text{max}}$ .

Aquests resultats es poden veure a la **Figura 8**, on es mostren les correlacions entre la fotosíntesi i les conductàncies ( $g_s$ ,  $g_m$ ) i paràmetres bioquímics ( $V_{c,\text{max}}$ , ETR). S'observa com, en general, les espècies s'agrupen segons el grup al qual pertanyen (equisets, falgueres, gimnospermes, nenúfars). Destaca com a excepció *Marsilea quadrifolia*, que degut al seus valors elevats de  $A_N$  i  $g_s$  es mostra separada de la resta de falgueres, si bé presenta uns valors similars a aquestes pel que fa a  $g_m$ ,  $V_{c,\text{max}}$  i ETR (veure taula 3). Es dugué a terme un anàlisi de correlació de Pearson i s'observaren correlacions positives significatives ( $P < 0,01$ ) entre  $A_N$  i  $g_s$  ( $R^2 = 0,636$ ),  $A_N$  i  $g_m$  ( $R^2 = 0,647$ ) i  $A_N$  i ETR ( $R^2 = 0,591$ ).



**Figura 8.** Correlacions entre l'assimilació neta de  $\text{CO}_2$  ( $A_N$ ) diferents paràmetres ( $g_s$ ,  $g_m$ ,  $V_{c,\text{max}}$ , ETR). Les formes diferents dels punts corresponen a cada un dels grups (equisets, falgueres, gimnospermes basals, nenúfars). A: *Equisetum arvense* B: *Equisetum ramosissimum* C: *Marsilea quadrifolia* D: *Dicksonia antarctica* E: *Davallia canariensis* F: *Polypodium cambricum* G: *Phlebodium aureum* H: *Ginkgo biloba* I: *Cycas revoluta* J: *Nymphaea alba* K: *Nuphar lutea*

En l'anàlisi de la resposta estomàtica enfront la irradiància (PPFD) i el  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) es presenten tota una sèrie de resultats. A la **Figura 9** es mostra la resposta a PPFD per a totes les espècies i a la **Taula 4** la resposta estomàtica estàndard a PPFD. Es realitzaren tests de Duncan ( $P < 0,05$ ) per a la corba de cada espècie i determinar diferències significatives entre els punts per comprovar si efectivament es produïa resposta estomàtica (variació de  $g_s$  a diferent PPFD). Les espècies que mostraren diferències significatives entre 3 o més punts són: *Equisetum ramosissimum*, *Marsilea quadrifolia* i *Cycas revoluta*, sent aquestes dues darreres les que mostren una major variació (10 i 8 punts diferents, respectivament). A *Nymphaea alba* l'únic punt diferent a la resta és el de  $1000 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La  $g_s$  en la resta d'espècies no varia entre diferents punts de PPFD. Aquest fet es veu reflectit a la taula 4: la resposta relativa és major en aquestes tres espècies, mentre que la resta no supera el 50% (un valor alt indica un major tancament estomàtic).

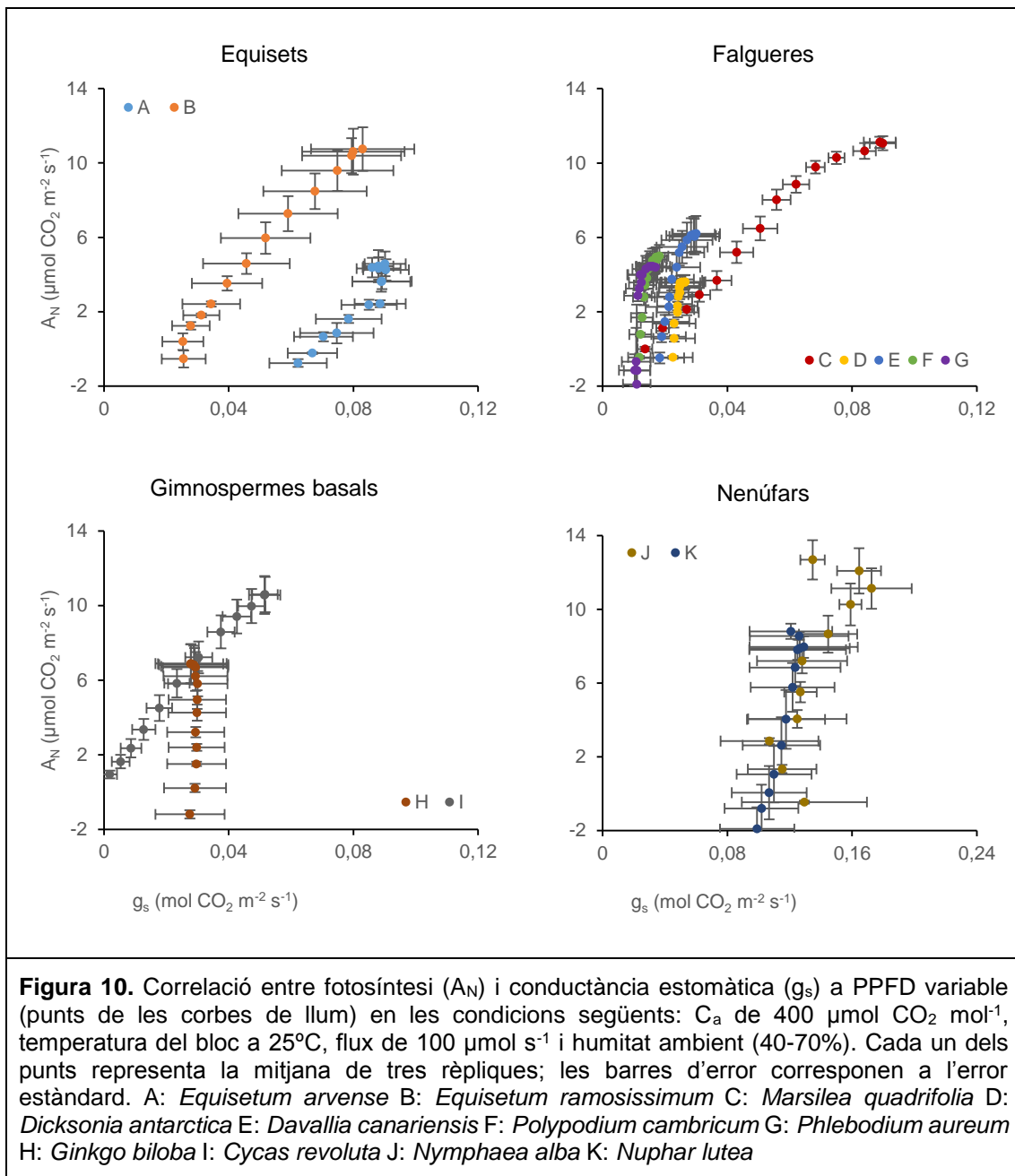


**Figura 9.** Resposta estomàtica ( $g_s$ ) en front a la irradiància (PPFD), en les condicions següents:  $C_a$  de  $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ , temperatura del bloc a  $25^\circ\text{C}$ , flux de  $100 \mu\text{mol s}^{-1}$  i humitat ambiental (40-70%). Cada un dels punts representa la mitjana de tres rèpliques; les barres d'error corresponen a l'error estàndard. A: *Equisetum arvense* B: *Equisetum ramosissimum* C: *Marsilea quadrifolia* D: *Dicksonia antarctica* E: *Davallia canariensis* F: *Polypodium cambricum* G: *Phlebodium aureum* H: *Ginkgo biloba* I: *Cycas revoluta* J: *Nymphaea alba* K: *Nuphar lutea*

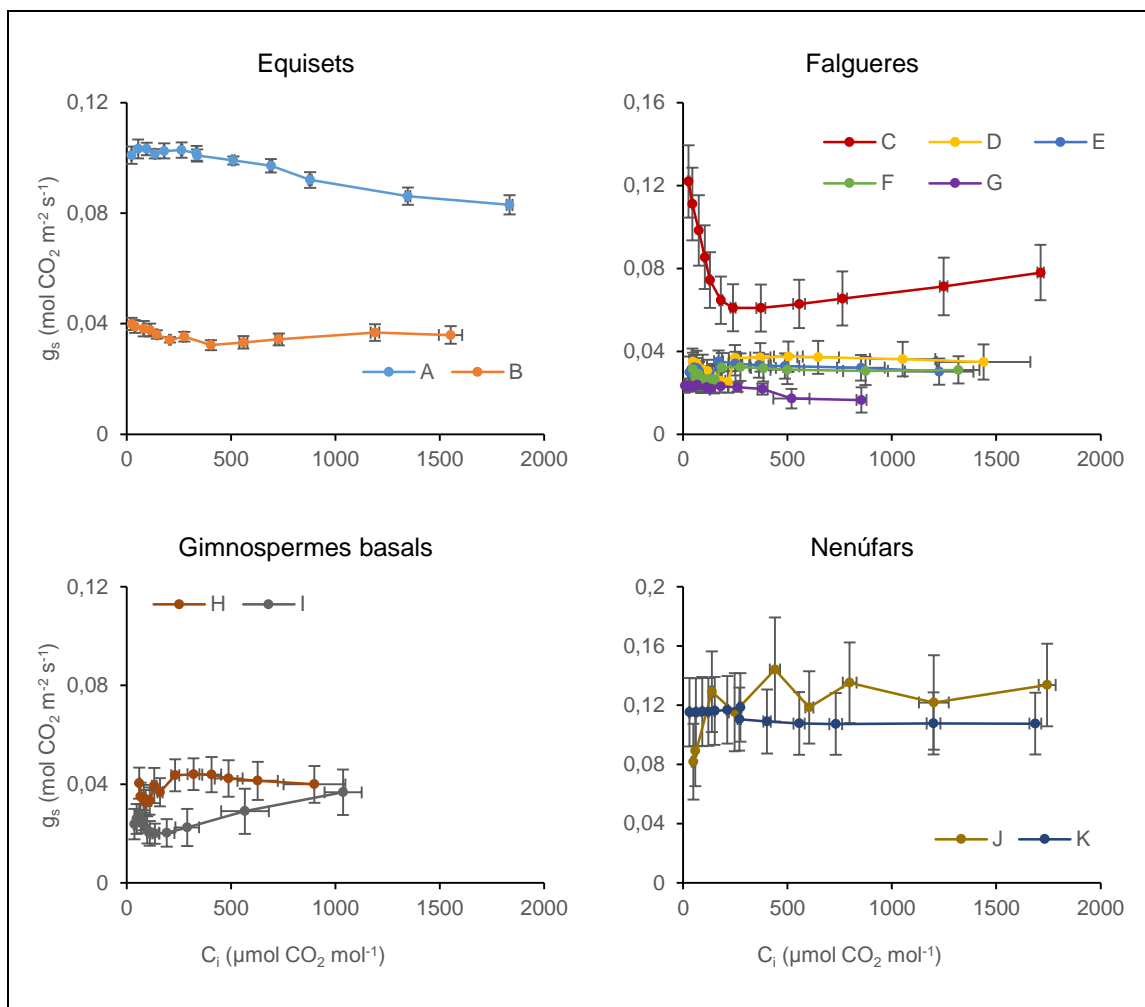
**Taula 4.** Respostes estomàtiques estàndard absolutes i relatives per al PPFD; s'han pres els punts 1500 i 0  $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . En el cas de *Nymphaea alba* s'ha pres el punt corresponent a 600  $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Els valors corresponen a les mitjanes i errors estàndard de tres rèpliques per espècie. Les lletres indiquen similituds i/o diferències significatives ( $P < 0,05$ ) segons el test de Duncan.

Espècie	Resposta estàndard absoluta a PPFD ( $\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Resposta estàndard relativa a PPFD (%)
<i>Equisetum arvense</i>	0,026 $\pm$ 0,006 <sup>abc</sup>	29,9 $\pm$ 7,6 <sup>a</sup>
<i>Equisetum ramosissimum</i>	0,058 $\pm$ 0,010 <sup>ef</sup>	69,9 $\pm$ 2,7 <sup>bc</sup>
<i>Marsilea quadrifolia</i>	0,076 $\pm$ 0,002 <sup>f</sup>	85,0 $\pm$ 2,0 <sup>cd</sup>
<i>Dicksonia antarctica</i>	0,004 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	15,1 $\pm$ 6,8 <sup>a</sup>
<i>Davallia canariensis</i>	0,012 $\pm$ 0,003 <sup>ab</sup>	46,3 $\pm$ 16,2 <sup>ab</sup>
<i>Polypodium cambricum</i>	0,007 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	36,4 $\pm$ 12,6 <sup>a</sup>
<i>Phlebodium aureum</i>	0,007 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	43,9 $\pm$ 11,5 <sup>ab</sup>
<i>Ginkgo biloba</i>	0,006 $\pm$ 0,000 <sup>a</sup>	28,2 $\pm$ 17,4 <sup>a</sup>
<i>Cycas revoluta</i>	0,053 $\pm$ 0,004 <sup>de</sup>	110,2 $\pm$ 3,9 <sup>d</sup>
<i>Nymphaea alba</i>	0,035 $\pm$ 0,014 <sup>cd</sup>	25,3 $\pm$ 14,0 <sup>a</sup>
<i>Nuphar lutea</i>	0,031 $\pm$ 0,009 <sup>bc</sup>	23,7 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>

A la **Figura 10** es mostra la correlació entre  $g_s$  i  $A_N$  per a cada espècie quan varia la irradiància (PPFD). S'establiren correlacions significatives ( $P < 0,01$ ) segons l'anàlisi de Pearson per a totes les espècies excepte per a les dues espècies de nenúfars i *Ginkgo biloba*. Si bé la  $A_N$  varia entre els punts en totes les espècies,  $g_s$  només varia significativament per a les espècies anteriorment mencionades. La relació entre els dos paràmetres indica la conservació del  $WUE_i$  a cada una de les espècies. Com major és la pendent de la recta de entre  $A/g_s$  menor és la conservació de  $WUE_i$ ; així com varia la irradiància. Si el valor de  $g_s$  es manté constant (com en la majoria de falgueres, *G. biloba* i els nenúfars) però  $A_N$  disminueix, davalla el  $WUE_i$ ; i per tant l'eficiència en l'ús de l'aigua no es manté a mesura que varia la irradiància.



A la **Figura 11** es mostra la resposta de  $g_s$  a  $C_i$ , i a la **Taula 5** les respostes estàndard al baix i elevat  $\text{CO}_2$ . Es realitzà el mateix anàlisi estadístic que a les corbes de resposta al PPFD per a determinar diferències entre els punts. S'analitzaren per separat les respostes al baix i a l'elevat  $\text{CO}_2$ . L'única espècie que presenta diferències per al baix  $\text{CO}_2$  ( $0\text{-}400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  de  $C_a$ ) és *M. quadrifolia*, on la  $g_s$  corresponent a  $0 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  de  $C_a$  és diferent a la resta. Per a l'elevat  $\text{CO}_2$  ( $400\text{-}2000 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  de  $C_a$ ), únicament *E. arvense* mostra diferències entre punts: la  $g_s$  a  $2000 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  de  $C_a$  és diferent a la resta.



**Figura 11.** Resposta estomàtica ( $g_s$ ) en front a la concentració de  $CO_2$  ( $C_i$ ), en les condicions següents: PPF saturant ( $>700 \mu\text{mol fons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), temperatura del bloc a  $25^\circ\text{C}$ , flux de  $100 \mu\text{mol s}^{-1}$  i humitat ambiental (40-70%). Cada un dels punts representa la mitjana de 4-6 rèpliques; les barres d'error corresponen a l'error estàndard. A: *Equisetum arvense* B: *Equisetum ramosissimum* C: *Marsilea quadrifolia* D: *Dicksonia antarctica* E: *Davallia canariensis* F: *Polypodium cambricum* G: *Phlebodium aureum* H: *Ginkgo biloba* I: *Cycas revoluta* J: *Nymphaea alba* K: *Nuphar lutea*

A la taula 5 es mostren les respostes estàndard. Per al baix  $CO_2$  la tendència general en les espècies és augmentar la conductància (valors negatius), sent les falgueres el grup amb una major resposta relativa (valor promig de  $-25,1\%$ ). Per a l'elevat  $CO_2$  la tendència no és tan clara, si bé la majoria d'espècies presenten una petita tendència a disminuir la conductància. No obstant cal recordar que aquests valors són només una aproximació ja que en la gran majoria d'espècies no s'han trobat diferències significatives entre els valors de  $g_s$ .

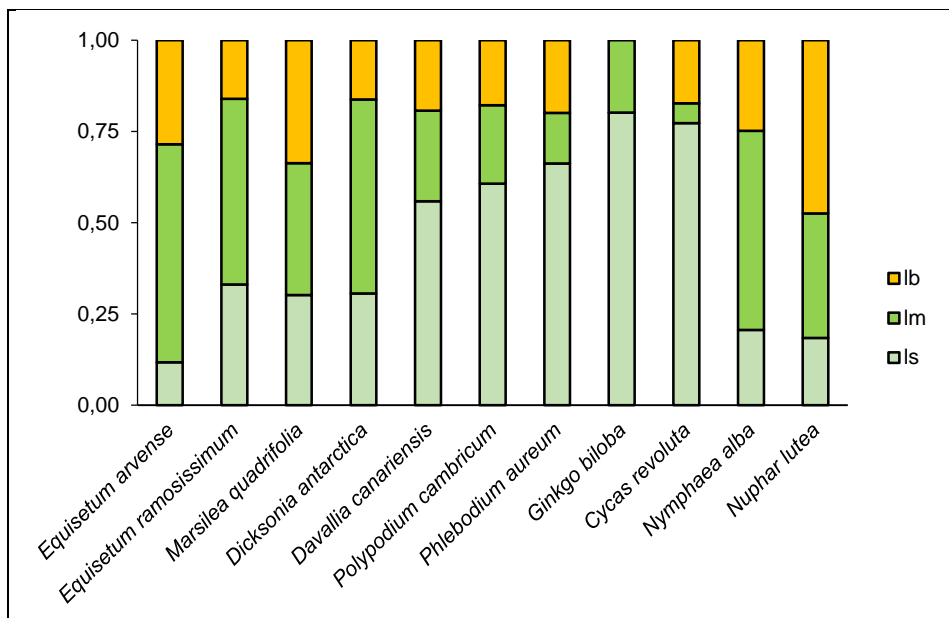
**Taula 5.** Respostes estomàtiques estàndard absolutes i relatives a la concentració de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>). El baix CO<sub>2</sub> correspon als punts de C<sub>a</sub> compresos entre 0 i 400 μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>, i l'elevat als punts entre 400 i 2000 μmol CO<sub>2</sub> mol<sup>-1</sup>. El signe positiu indica tancament estomàtic i el negatiu apertura. Els valors corresponen a les mitjanes i errors estàndard de 4-6 rèpliques per espècie. Les lletres indiquen similituds i/o diferències significatives (P < 0,05) segons el test de Duncan.

Espècie	Resp. Est. absoluta a baix CO <sub>2</sub> (mol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Resp. Est. relativa a baix CO <sub>2</sub> (%)	Resp. Est. absoluta a elevat CO <sub>2</sub> (mol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	Resp. Est. relativa a elevat CO <sub>2</sub> (%)
<i>Equisetum arvense</i>	0,001 ± 0,005 <sup>b</sup>	1,1 ± 4,5 <sup>b</sup>	0,018 ± 0,004 <sup>a</sup>	17,5 ± 4,2 <sup>cd</sup>
<i>Equisetum ramosissimum</i>	-0,005 ± 0,001 <sup>b</sup>	-11,4 ± 2,5 <sup>bc</sup>	-0,001 ± 0,002 <sup>a</sup>	-1,5 ± 6,8 <sup>bcd</sup>
<i>Marsilea quadrifolia</i>	-0,061 ± 0,009 <sup>c</sup>	-50,3 ± 4,8 <sup>d</sup>	-0,017 ± 0,005 <sup>a</sup>	-30,1 ± 8,6 <sup>bc</sup>
<i>Dicksonia antarctica</i>	-0,010 ± 0,002 <sup>b</sup>	-27,9 ± 6,0 <sup>cd</sup>	0,002 ± 0,003 <sup>a</sup>	8,9 ± 11,1 <sup>bcd</sup>
<i>Davallia canariensis</i>	-0,010 ± 0,002 <sup>b</sup>	-26,2 ± 3,6 <sup>c</sup>	0,005 ± 0,002 <sup>a</sup>	17,3 ± 7,9 <sup>cd</sup>
<i>Polypodium cambricum</i>	-0,004 ± 0,002 <sup>b</sup>	-16,0 ± 7,2 <sup>bc</sup>	0,001 ± 0,001 <sup>a</sup>	3,3 ± 3,4 <sup>bcd</sup>
<i>Phlebodium aureum</i>	-0,002 ± 0,004 <sup>b</sup>	-5,2 ± 15,2 <sup>bc</sup>	0,007 ± 0,006 <sup>a</sup>	27,9 ± 27,5 <sup>d</sup>
<i>Ginkgo biloba</i>	-0,002 ± 0,002 <sup>b</sup>	-3,0 ± 8,3 <sup>bc</sup>	0,004 ± 0,003 <sup>a</sup>	9,8 ± 6,3 <sup>bcd</sup>
<i>Cycas revoluta</i>	-0,006 ± 0,004 <sup>b</sup>	-15,9 ± 16,9 <sup>bc</sup>	-0,017 ± 0,006 <sup>a</sup>	-93,0 ± 27,9 <sup>a</sup>
<i>Nymphaea alba</i>	0,026 ± 0,005 <sup>a</sup>	37,2 ± 7,9 <sup>a</sup>	-0,018 ± 0,028 <sup>a</sup>	-35,9 ± 28,6 <sup>b</sup>
<i>Nuphar lutea</i>	-0,005 ± 0,002 <sup>b</sup>	-3,3 ± 0,9 <sup>bc</sup>	0,011 ± 0,005 <sup>a</sup>	8,6 ± 2,7 <sup>bcd</sup>

Els resultats de l'anàlisi de les limitacions fotosintètiques es mostren a la **Taula 6** i a la **Figura 12**. Com major és el valor del factor limitant (conductància estomàtica, conductància del mesòfil o factor bioquímic) implica que major és la limitació d'aquest comparat amb la resta. Les limitacions s'expressen sobre 1. A la taula 6 es presenten tots els valors calculats per a cada espècie. Es mostren les limitacions estomàtiques ( $I_s$ ), les limitacions per la conductància del mesòfil ( $I_m$ ) i les bioquímiques ( $I_b$ ). També s'han agrupat a la taula 6 en limitacions no estomàtiques ( $I_m + I_b$ ) i limitacions difusives ( $I_s + I_m$ ). El gràfic de la figura 12 mostra el valor relatiu de cada factor per a cada espècie, ordenades segons la història evolutiva per així poder observar la tendència evolutiva general.

**Taula 6.** Anàlisi quantitatiu de les limitacions a la fotosíntesi a les diferents espècies segons Grassi & Magnani (2005).  $I_s$ : Limitacions estomàtiques ( $g_s$ )  $I_m$ : limitacions del mesòfil ( $g_m$ )  $I_b$ : Limitacions bioquímiques ( $V_{c,max}$ )

Espècie	$I_s$	$I_m$	$I_b$	$I_m + I_b$	$I_s + I_m$
<i>Equisetum arvense</i>	0,12	0,60	0,28	0,88	0,72
<i>Equisetum ramosissimum</i>	0,33	0,51	0,16	0,67	0,84
<i>Marsilea quadrifolia</i>	0,30	0,36	0,34	0,70	0,66
<i>Dicksonia antarctica</i>	0,31	0,53	0,16	0,69	0,84
<i>Davallia canariensis</i>	0,56	0,25	0,19	0,44	0,81
<i>Polypodium cambricum</i>	0,61	0,22	0,18	0,40	0,83
<i>Phlebodium aureum</i>	0,66	0,14	0,20	0,34	0,80
<i>Ginkgo biloba</i>	0,80	0,20	0,00	0,20	1,00
<i>Cycas revoluta</i>	0,77	0,05	0,17	0,22	0,82
<i>Nymphaea alba</i>	0,21	0,54	0,25	0,79	0,75
<i>Nuphar lutea</i>	0,18	0,34	0,47	0,80	0,52



**Figura 12.** Anàlisi quantitatiu de les limitacions a la fotosíntesi a les diferents espècies segons Grassi & Magnani (2005). El gràfic mostra les limitacions relatives per a cada espècie.  $I_s$ : Limitacions estomàtiques ( $g_s$ )  $I_m$ : limitacions del mesòfil ( $g_m$ )  $I_b$ : Limitacions bioquímiques ( $V_{c,max}$ )



## DISCUSSIÓ

Els valors de LMA mesurats varien entre espècies però en general es situen en el rang propi del grup: tant *Equisetum arvense* com *E. ramosissimum* presenten uns valors similars a *E. telmateia*, sent el valor d'aquest intermedi entre les dues espècies mesurades en el present treball (Carriquí *et al*, 2014). Dins les falgueres cal destacar *Marsilea quadrifolia*, doncs presenta el valor més baix reportat a les falgueres: 17,7 g m<sup>-2</sup> (Gago *et al*, 2013), sent similar a altres dades corresponents al gènere *Marsilea* (Wu & Kao, 2011). Els nenúfars també presenten valors molt baixos (mitjana de 27,0 g m<sup>-2</sup>). Aquests valors, tant per a *M. quadrifolia* com per als nenúfars, es relacionen amb l'hàbitat aquàtic: les plantes d'aigua dolça presenten una mitjana 16 g m<sup>-2</sup>, característica que es relaciona amb les particularitats del seu hàbitat (Poorter *et al*, 2009). La mitjana de totes les falgueres estudiades entra dins el rang descrit a Poorter *et al* (2009) per a falgueres i per a hàbitats humits. *Cycas revoluta* també presenta un valor similar a la mitjana de les gimnospermes (227 g m<sup>-2</sup>) (Poorter *et al*, 2009) mentre que *Ginkgo biloba* presenta un valor menor, similar als ja descrits per aquesta espècie Overdieck & Strassemeier, 2004).

Les corbes de resposta estomàtica tant a la llum com al CO<sub>2</sub> mostren, en general, una baixa resposta als dos factors, especialment al CO<sub>2</sub> (veure figures 9 i 11). No obstant, a la taula 4 s'observa com totes les espècies reaccionen reduint l'obertura estomàtica (valors de resposta positius). Tanmateix, tret de a *Equisetum ramosissimum*, *M. quadrifolia* i *C. revoluta* la resposta a la resta d'espècies és insuficient per mantenir una WUE<sub>i</sub> constant i elevada a diferents irradiàncies (figura 10) (Brodribb *et al*, 2009). La baixa resposta estomàtica en les falgueres és atribuïble a que aquestes plantes no responen a l'àcid abscísic (Brodribb & McAdam, 2013; McAdam & Brodribb, 2012). Tot i ser angiospermes, els nenúfars no mostren resposta a la llum i al CO<sub>2</sub>; aquest grup presenta característiques estructurals foliars que permeten uns elevats valors de fotosíntesi (Feild *et al*, 2009) però els estomes manquen de cavitat subestomàtica, i per tant les cèl·lules oclusives i de guarda no poden canviar la seva morfologia i regular l'obertura estomàtica, romanent aquests permanentment oberts (Feild & Arens, 2005). Tanmateix, al ser plantes aquàtiques l'estat hídic de la planta no es veu compromès tot i que no es mantingui la WUE<sub>i</sub> (figura 10). El cas de *Marsilea quadrifolia* és prou singular ja que és la única espècie de falguera estudiada que respon significativament tant a la llum com al baix CO<sub>2</sub> (85 i 50%, respectivament), sent el valor per al CO<sub>2</sub> superior a les espècies de falgueres mesurades (Brodribb *et al*, 2009; Creese *et al*, 2014) i similar a la resposta observada en coníferes (Brodribb *et al*, 2009). No obstant, la resposta de *M. quadrifolia* a l'elevat CO<sub>2</sub> és obrir estomes (taula 5), mostra de la diversitat de la regulació estomàtica a les falgueres i que la resposta estomàtica es pot donar en direccions oposades (Creese *et al*, 2014). La resposta estomàtica de *M. quadrifolia* contrasta amb la dels nenúfars: aquestes espècies són aquàtiques i no obstant, mostren una resposta estomàtica oposada. En el cas dels nenúfars, aquests no mostren resposta estomàtica tot i que la resta d'Angiospermes sí presenta aquesta resposta (Brodribb *et al*, 2009; Brodribb & McAdam, 2014). En canvi, *M. quadrifolia* mostra resposta per a la llum i al CO<sub>2</sub> mentre que la resta d'espècies de falgueres no (Brodribb *et al*, 2009; Creese *et al*, 2014). Aquest fet pot indicar que l'hàbitat no és determinant per al desenvolupament del control estomàtic, i aquest es troba més influït per la història evolutiva (McAdam & Brodribb, 2012). *C. revoluta* mostra una resposta similar: al contrari que *G. biloba*, sí respon a variacions en la irradiància (mostrant la major resposta en les espècies estudiades, 110%), però la resposta a l'elevat CO<sub>2</sub> és baixa (15%). No obstant, la resposta a l'elevat CO<sub>2</sub> és inesperada, segons Brodribb *et al* (2009): en lloc de tancar estomes mostra una gran obertura (90%), tot i que l'error entre mostres és elevat.

El fet de que no s'observi una tendència clara en la evolució del control estomàtic suposa que els diferents grups de plantes poden haver desenvolupat independentment els mecanismes de control estomàtic, fet observat en espècies com *E. ramosissimum* i *M. quadrifolia*. També en el cas de les Gimnospermes, on *C. revoluta* es situa en una posició més basal que *G. biloba* (Qui *et al*, 2007) però en canvi la primera mostra resposta estomàtica per a la llum mentre que la segona no. Per tant, l'evolució de la resposta estomàtica en els diferents grups és més complexa del que es pensava (McAdam & Brodribb, 2012). També pot haver tingut lloc una pèrdua secundària del control estomàtic al llarg de l'evolució, com podria ser el cas dels nenúfars, ja que per a la resta d'Angiospermes està descrita la resposta estomàtica completa (Brodribb *et al*, 2009;

McAdam & Brodribb *et al*, 2012). En aquest sentit seria interessant per a investigacions futures observar la resposta estomàtica a *Amborella trichopoda*, l'espècie més basal de les Angiospermes, i famílies com Austrobaileyaceae o Chloranthaceae, també situades a la base de l'arbre filogenètic de les Angiospermes (Qui *et al*, 2007; Feild *et al*, 2009). En Angiospermes està descrita la regulació de la resposta estomàtica al CO<sub>2</sub> per Ca<sup>2+</sup> (Brodribb & McAdam, 2013); també seria interessant per a investigacions futures observar si la nul·la resposta estomàtica dels nenúfars es veu deguda únicament a que manquen de cavitat subestomàtica (Feild & Arens, 2005) o que tampoc presenten resposta a Ca<sup>2+</sup>. Els resultats també confirmen la independència en les respostes a la llum i al CO<sub>2</sub> (Creese *et al*, 2014), sent la única espècie que presenta una elevada resposta a ambdós factors *M. quadrifolia*.

Els equisets i les falgueres no presenten diferències en els seus valors de fotosíntesi a excepció de *M. quadrifolia*, que presenta un valor significativament elevat, similar al mesurat per Wu & Kao (2011). Els valors a les falgueres es troben en el rang d'altres espècies estudiades (Gago *et al*, 2013; Carriquí *et al*, 2014) si bé els equisets presenten un valor menor al mesurat a *Equisetum telmateia* (Carriquí *et al*, 2014). Les espècies de fanerògames presenten uns valors que es troben dins els rang descrit per aquestes (Wright *et al*, 2005). Dins les espècies estudiades s'observa, en línies generals, un augment de la fotosíntesi a través de la història evolutiva, sent les més baixes per a les falgueres i els equisets i les més elevades per a les gimnospermes i els nenúfars (veure taula 3). La fotosíntesi dels nenúfars estudiats és major que altres espècies d'Angiospermes basals, com *Amborella trichopoda* i *Austrobaileya scandens* (Feild *et al*, 2009; Feild *et al*, 2003). La conductància estomàtica en condicions estàndard de les falgueres és menor que la reportada per altres espècies a Brodribb *et al* (2009) i Carriquí *et al* (2014) però és similar a la descrita per Gago *et al* (2013). La g<sub>s</sub> de les gimnospermes basals és menor que la descrita per diferents espècies de coníferes (Brodribb *et al*, 2009; Flexas *et al*, 2012). Els nenúfars, en canvi, presenten uns valors lleugerament superiors als reportats en altres estudis per a *Nuphar lutea* (Snir *et al*, 2006) encara que no són tan elevats com els d'angiospermes superiors (Flexas *et al*, 2012). Els valors més baixos de WUE<sub>i</sub> corresponen a *Equisetum arvense*, seguits per les falgueres més primitives (*Marsilea quadrifolia* i *Dicksonia antarctica*) i els nenúfars; en el cas dels nenúfars el valor baix està associat a la seva naturalesa com a planta aquàtica (Feild *et al*, 2009). Les falgueres més evolucionades (*Davallia canariensis*, *Polypodium cambricum* i *Phlebodium aureum*) presenten uns valors elevats, similars als de les gimnospermes estudiades; aquest fet probablement es troba relacionat en que són espècies epífites (veure taula 1) i per tant es troben adaptades a una menor disponibilitat d'aigua (Hietz & Briones, 1998). La conductància del mesòfil segueix certa tendència evolutiva: tots els valors són superiors als descrits per als briòfits (Flexas *et al*, 2012) i tant els equisets com les falgueres, amb uns valors similars a les espècies estudiades per Gago *et al* (2013) i Carriquí *et al* (2014), presenten uns valors menors que les coníferes descrites (Flexas *et al*, 2012) i que *C. revoluta* i *G. biloba*. La g<sub>m</sub> de *C. revoluta* i *G. biloba* es correspon amb els valors publicats per a coníferes (Flexas *et al*, 2012). Els valors dels nenúfars són menors dels habituals en Angiospermes (Flexas *et al*, 2012). Els valors més baixos observats en les falgueres respecte als altres grups es deuen a modificacions en la ultraestructura anatòmica de les fulles (Carriquí *et al*, 2014).

A la figura 8 s'observen diferències entre els equisets i falgueres i la resta de grups. Les correlacions indiquen que els valors majors de fotosíntesi són conseqüència de dos factors: l'augment d'ambdues conductàncies (g<sub>s</sub> i g<sub>m</sub>) i de la ETR. La correlació amb V<sub>c,max</sub> no és significativa per a les espècies estudiades, si bé tant *C. revoluta* com *G. biloba* mostren una major V<sub>c,max</sub> que la resta d'espècies, juntament amb una major fotosíntesi. A les gràfiques de la figura 8 les espècies tendeixen a agrupar-se segons el grup filogenètic al qual pertanyen, indicant que la història evolutiva és un factor determinant per a explicar les característiques fotosintètiques.

Els resultats de l'anàlisi de les limitacions fotosintètiques (figura 12A) mostren una clara tendència evolutiva, excepte per les limitacions bioquímiques, que romanen més o menys constants a través de les diferents espècies, sense mostrar cap tendència. La limitació principal a les espècies més primitives (equisets, *M. quadrifolia* i *Dicksonia antarctica*) és la conductància del mesòfil, especialment en el cas dels equisets i de *D. antarctica*, on arriba a suposar més de la meitat de les limitacions totals (veure taula 6); aquests resultats concorden amb els publicats

per a falgueres (Carriquí *et al*, 2014; Gago *et al*, 2013). Les espècies més evolucionades de falgueres, no obstant, mostren una reducció en la limitació per la  $g_m$  i un augment proporcional en la limitació estomàtica: a través dels equisets i falgueres,  $g_m$  és el component limitant en les espècies més primitives mentre que  $g_s$  va cobrant una major importància com a principal factor fins a les primeres gimnospermes, on arriba a suposar el 0,77 i 0,80 de les limitacions en les dues espècies. En aquest punt hi ha una tendència evolutiva cap a la conductància estomàtica com a factor limitant més important. Aquest fet és prou significatiu ja que la tendència cap a una major limitació per  $g_s$  no es veu acompanyada per una regulació més fina del control estomàtic, sent la única notable excepció *C. revoluta*. En els nenúfars, en canvi, al ser els valors de  $g_s$  superiors, la fotosíntesi es troba més limitada pels altres dos factors, especialment per  $g_m$  en el cas de *Nymphaea alba*. En altres Angiospermes estudiades les limitacions tendeixen més a ser equitatives (Carriquí *et al*, 2014); per als nenúfars, per contra, les limitacions no estomàtiques són les més importants.

## CONCLUSIONS

En primer lloc, aquest estudi aporta noves dades sobre les característiques fotosintètiques en espècies basals, en grups poc estudiats com els equisets, falgueres, gimnospermes basals i nenúfars al llarg de la història evolutiva de les plantes. S'observa un augment de la fotosíntesi neta al llarg dels grups. En general, els valors de les conductàncies estomàtica i del mesòfil, així com els paràmetres bioquímics, segueixen certa coherència, augmentant els valors en l'escala evolutiva. Pel que fa al control estomàtic, no s'observa una tendència evolutiva clara i es posa de manifest certa heterogeneïtat en les respostes a les plantes basals, si bé en general responen més a la llum que al  $CO_2$ , sent aquests dos factors independents. Els resultats indiquen que el control estomàtic possiblement ha evolucionat diverses vegades al llarg de la història de les plantes. Les limitacions difusives són les principals per a totes les espècies. La limitació més important per a les plantes més primitives és l'exercida per la difusió a través del mesòfil, mentre que per a les falgueres més evolucionades i les gimnospermes la difusió a través dels estomes constitueix el major factor limitant. En els nenúfars, no obstant, les limitacions són més similars entre els diferents factors.

## AGRAÏMENTS

Agraeixo al meu tutor, el Dr Jaume Flexas la seva guia i ajuda durant l'elaboració del treball. També agraeixo al Dr Cyril Douthe la seva ajuda en les tècniques de mesura. Finalment, agraeixo al Dr Jorge Gago el seu suport i consell durant tot el treball.

## REFERÈNCIES

- Anthos. 2012. Sistema de información de las plantas de España. Real Jardín Botánico, CSIC - Fundación Biodiversidad. Recurs electrònic a [www.anthos.es](http://www.anthos.es). Consulta realitzada 2/8/2014
- Bauer H, Martha P. 1981. *The CO<sub>2</sub> Compensation Point of C<sub>3</sub> Plants - A Re-Examination I. Interspecific Variability*. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 103 (5): 445-450
- Beerling DJ, McElwain JC, Osborne CP. 1998. *Stomatal responses of the 'living fossil' Ginkgo biloba L. to changes in atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations*. Journal of Experimental Botany, 49 (326): 1603-1607
- Bernacchi CJ, Portis AR, Nakano H, von Caemmerer S, Long SP. 2002. *Temperature Response of Mesophyll Conductance. Implications for the Determination of Rubisco Enzyme Kinetics and for Limitations to Photosynthesis in Vivo*. Plant Physiology, 130 (4): 1992-1998
- Boyer JS, Chin Wong S, Farquhar GD. 1997. *CO<sub>2</sub> and Water Vapor Exchange across Leaf Cuticle (Epidermis) at Various Water Potentials*. Plant Physiology, 114: 185-191
- Brodribb TJ, McAdam SAM, Jordan GJ, Feild TS. 2009. *Evolution of stomatal responsiveness to CO<sub>2</sub> and optimization of water-use efficiency among land plants*. New Phytologist, 183:
- Brodribb TJ, McAdam SAM. 2011. *Passive Origins of Stomatal Control in Vascular Plants*. Science, 331: 582-585
- Brodribb TJ, McAdam SAM. 2013. *Unique Responsiveness of Angiosperm Stomata to Elevated CO<sub>2</sub> Explained by Calcium Signalling*. PLoS ONE, 8 (11): e82057
- Carriquí M, Cabrera HM, Conesa MA, Coopman RE, Douthe C, Gago J, Gallé A, Galmés J, Ribas-Carbó M, Tomás M, Flexas J. 2014. *Diffusional limitations explain the lower photosynthetic capacity of ferns as compared with angiosperms in a common garden study*. Plant, Cell & Environment, doi: 10.1111/pce.12402
- Cornelissen JHC, Lavorel S, Garnier E, Díaz S, Buchmann N, Gurvich DE, Reich PB, ter Steege H, Morgan HD, van der Heijden MGA, Pausas JG, Poorter H. 2003. *A handbook of protocols for standardized and easy measurement of plant functional traits worldwide*. Australian Journal of Botany, 51: 335-380
- Creese C, Oberbauer S, Rundel P, Sack L. 2014. *Are fern stomatal responses to different stimuli coordinated? Testing responses to light, vapor pressure deficit, and CO<sub>2</sub> for diverse species grown under contrasting irradiances*. New Phytologist, 204: 92-104
- Díaz TE, Fernández-Carvajal M, Fernández JA. 2004. *Curso de Botánica*. Ediciones Trea, S.L.
- Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA. 1980. *A Biochemical Model of Photosynthetic CO<sub>2</sub> Assimilation in Leaves of C<sub>3</sub> Species*. Planta, 149: 78-90
- Field TS, Franks PJ, Sage TL. 2003. *Ecophysiological shade adaptation in the basal Angiosperm Austrobaileya scandens (Austrobaileyaceae)*. Int. J. Plant Sci., 164 (2): 313-324
- Feild TS, Arens NC. 2005. *Form, function and environments of the early angiosperms: merging extant phylogeny and ecophysiology with fossils*. New Phytologist, 166: 383-408
- Feild TS, Chatelet DS, Brodribb TJ. 2009. *Ancestral xerophobia: a hypothesis on the whole plant ecophysiology of early angiosperms*. Geobiology, 7 (2): 237-264
- Flexas J, Díaz-Espejo A, Berry JA, Cifre J, Galmés J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbó M. 2007. *Analysis of leakage in IRGA's leaf chambers of open gas exchange systems: quantification and its effects in photosynthesis parameterization*. Journal of Experimental Botany, 58 (6): 1533-1543

- Flexas J, Díaz-Espejo A, Galmés J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbó M. 2007. *Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO<sub>2</sub> concentration around leaves*. Plant, Cell and Environment, 30: 1284-1298
- Flexas J, Barbour MM, Brendel O, Cabrera HM, Carriqui M, Díaz-Espejo A, Douthe C, Dreyer E, Ferrio JP, Galle A, Galmés J, Kodama N, Medrano H, Niinemets U, Peguero-Pina JJ, Pou A, Ribas-Carbó M, Tomàs M, Tosens T, Warren CR. 2012. *Mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub>: An unappreciated central player in photosynthesis*. Plant Sciences, 193-194: 70-84
- Flexas J, Niinemets U, Gallé A, Barbour MM, Centritto M, Díaz-Espejo A, Douthe C, Galmés J, Ribas-Carbó M, Rodríguez PL, Rosselló F, Soolanayakanahally R, Tomàs M, Wright IJ, Farquhar GD, Medrano H. 2013. *Diffusional conductances to CO<sub>2</sub> as a target for increasing photosynthesis and photosynthetic water-use efficiency*. Photosynthesis Res, 117: 45-59
- Flora of North America. 2008. Recurs electrònic a [www.eFloras.org](http://www.eFloras.org). Consulta realitzada 2/8/2014
- Gago J, Coopman RE, Marino Cabrera H, Hermida C, Molins A, Conesa MA, Galmés J, Ribas-Carbó M, Flexas J. 2013. *Photosynthesis limitations in three fern species*. Physiologia Plantarum, 149 (4): 599-611
- Gago J, Douthe C, Florez-Sansa I, Escalona JM, Galmés J, Fernie AR, Flexas J, Medrano H. 2014. *Opportunities for improving leaf water use efficiency under climate change conditions*. Plant Science, <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.04.007>
- Genty B, Briantais J-M, Baker NR. 1989. *The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and photochemical quenching of chlorophyll fluorescence*. Biochim Biophys Acta, 990: 87-92
- Grassi G, Magnani F. 2005. *Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees*. Plant, Cell and Environment, 28: 834-849
- Harbinson J, Genty B, Baker NR. 1989. *Relationship between the Quantum Efficiencies of Photosystems I and II in Pea Leaves*. Plant Physiology, 90: 1029-1034
- Harley PC, Loreto F, Di Marco G, Sharkey TD. 1992. *Theoretical considerations when estimating the mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> flux by analysis of the response of photosynthesis to CO<sub>2</sub>*. Plant Physiol, 98: 1429-1436
- Haworth M, Elliot-Kingston C, McElwain JC. 2011. *Stomatal control as a driver of plant evolution*. Journal of Experimental Botany, 62 (8): 2419-2423
- Haworth M, Elliot-Kingston C, McElwain JC. 2013. *Co-ordination of physiological and morphological responses of stomata to elevated [CO<sub>2</sub>] in vascular plants*. Oecologia, 171: 71-82
- Herbari Virtual del Mediterrani Occidental. 2007. Recurs electrònic a [www.herbarivirtual.uib.es](http://www.herbarivirtual.uib.es). Consulta realitzada 2/8/2014
- Hietz P, Briones O. 1998. *Correlation between water relations and within-canopy distribution of epiphytic ferns in a Mexican cloud forest*. Oecologia, 114: 305-316
- Hill KD. 2010. *Cycas revoluta*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. Recurs electrònic a [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Consulta realitzada 2/8/2014
- Kew Royal Botanic Gardens. 2014. Recurs electrònic a [www.kew.org](http://www.kew.org). Consulta realitzada 2/8/2014
- Krenzer Jr EG, Moss DN, Crookston RK. 1975. *Carbon Dioxide Compensation Points of Flowering Plants*. Plant Physiology, 56: 194-206

- Long SP, Bernacchi CJ. 2003. *Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error.* Journal of Experimental Botany, 4 (392): 2393-2401
- Marler TE, Willis LE. 1997. *Leaf Gas-Exchange Characteristics of sixteen Cycad Species.* J. Amer. Soc. Hort. Sci., 122 (1): 38-42
- McAdam SAM, Brodribb TJ. 2012. *Stomatal innovation and the rise of seed plants.* Ecology Letters, 15: 1-8
- McAdam SAM, Brodribb TJ. 2012. *Fern and Lycophyte Guard Cells Do Not Respond to Endogenous Abscisic Acid.* The Plant Cell, 24: 1510-1521
- Nagalingum NS, Marshall CR, Quental TB, Rai HS, Little DP, Mathews S. 2011. *Recent Synchronous Radiation of a Living Fossil.* Science, 334: 796-799
- Pandey S, Kumar S, Nagar PK. 2003. *Photosynthetic performance of Ginkgo biloba L. grown under high and low irradiance.* Photosynthetica, 41 (4): 505-511
- Poorter H, Niinemets Ü, Poorter L, Wright IJ, Villar R. 2009. *Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis.* New Phytologist, 182: 565-588
- Overdieck D, Strassemeier J. 2004. *Gas exchange of Ginkgo biloba leaves at different CO<sub>2</sub> concentration levels.* Flora, 200: 159-167
- Qui Y-L, Li L, Wang B, Chen Z, Dombrowska O. 2007. *Non-Flowering Land Plant Phylogeny Inferred from Nucleotide Sequences of Seven Chloroplast, Mitochondrial and Nuclear Genes.* International Journal of Plant Sciences, 168 (5): 691-708
- Schuettpelz E, Pryer KM. 2007. *Fern phylogeny inferred from 400 leptosporangiate species and three plastid genes.* Taxon, 56 (4): 1037-1050
- Sharkey TD, Bernacchi CJ, Farquhar GD, Singsaas EL. 2007. *Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C<sub>3</sub> leaves.* Plant, Cell and Environment, 30: 1035-1040.
- Smith AR, Pryer KM, Schuettpelz E, Korall P, Schneider H, Wolf PG. 2006. *A Classification for Extant Ferns.* Taxon, 55 (3): 705-731
- Snir A, Gurevitz M, Marcus Y. 2006. *Alterations in Rubisco activity and in stomatal behavior induce a daily rhythm in photosynthesis of aerial leaves in the amphibious-plant Nuphar lutea.* Photosynth Res, 90: 233-242
- Tambussi EA, Graciano C. 2010. *Capítulo 8. Técnicas de medición de intercambio de gases en plantas: Curvas de respuesta de la fotosíntesis a la luz y el CO<sub>2</sub> en Fernández ME, Gyenge JE (ed.) Técnicas de Medición en Ecofisiología Vegetal. INTA - DDIB*
- Valentini R, Epron D, De Angelis P, Matteucci G, Dreyer E. 1995. *In situ estimation of net CO<sub>2</sub> assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (Q. cerris L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply.* Plant, Cell and Environment, 18: 631-640
- Varela S, Caballé G, Curetti M, Portela J. 2010. *Capítulo 7. Sistemas IRGA en la medición de intercambio gaseoso en Fernández ME, Gyenge JE (ed.) Técnicas de Medición en Ecofisiología Vegetal. INTA – DDIB*
- Wright IJ, Reich PB, Cornelissen JHC, Falster DS, Garnier E, Hikosaka K, Lamont BB, Lee W, Oleksyn J, Osada N, Poorter H, Villar R, Warton DI, Westoby M. 2005. *Assessing the generality of global leaf trait relationships.* The New Phytologist, 166: 485-496
- Wu T-C, Kao W-Y. 2011. *Ecophysiological Traits of Leaves of Three Marsilea Species Distributed in Different Geographical Regions.* Taiwania, 56 (4): 279-286