



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Caracterització morfològica i ecofisiològica de plantes basals

Mireia Campoy Altés

Grau de Biologia

Any acadèmic 2018-19

Treball tutelat per Dr. Jaume Flexas Sans
Departament de Biologia.

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

Angiosperma basal, anatomia foliar, fotosíntesi, assimilació neta, conductància estomàtica, conductància del mesòfil, eficiència en l'ús de l'aigua.

ÍNDEX

RESUM:	4
ABSTRACT:	4
INTRODUCCIÓ:	5
MATERIAL I MÈTODES:	7
MATERIAL VEGETAL.....	7
PRESA DE MESURES DE PARÀMETRES FISIOLÒGICS	8
FIXACIÓ DE LES MOSTRES ANATÒMIQUES I PRESA DE MESURES	8
ANÀLISI ESTADÍSTICA	9
RESULTATS:	10
CARACTERITZACIÓ DE L'ANATOMIA FOLIAR D'ANGIOSPERMES BASALS	10
CARACTERITZACIÓ DELS PARÀMETRES FISIOLÒGICS D'ANGIOSPERMES BASALS.	11
COMPARACIÓ ANATÒMICA I FISIOLÒGICA D'ANGIOSPERMES BASALS	12
DISCUSSIÓ:	14
CONCLUSIÓ:	16
AGRAÏMENTS:	16
REFERÈNCIES:	17

RESUM

Les angiospermes primitives es creu que tenen una taxa fotosintètica inferior a les angiospermes més recents, degut al fet de que la gruixa foliar de les plantes basals és més elevada. Com a conseqüència d'això, la difusió de CO₂ queda limitada i, per tant, la taxa de fotosíntesi és més baixa. Encara que s'han realitzat nombrosos estudis comparant l'anatomia i fisiologia de falgueres i angiospermes, angiospermes i gimnospermes o altres tipus vegetals, són pocs els estudis que s'han centrat en la comparació de plantes basals i plantes més recents des del punt de vista evolutiu. En aquest treball es fa una comparació entre diverses espècies d'angiospermes basals analitzant la seva anatomia foliar i característiques fisiològiques i, posteriorment, una comparació de totes aquestes espècies amb espècies d'angiospermes que resulten ser més recents evolutivament parlant. Alguns resultats demostren la primera hipòtesi exposada, però d'altres suggereixen una hipòtesi contrària, la qual exposa valors d'assimilació neta i conductància estomàtica elevats quan la gruixa foliar també és alta. Aquest fet pot suggerir que a major gruixa de fulla, major acumulació de pigments fotosintètics i Rubisco, per tant valors d'assimilació neta major, encara que els valors de conductància estomàtica i conductància del mesòfil siguin baixos.

ABSTRACT

It is thought that primitive angiosperms have a lower photosynthetic rate than the most recent angiosperms due to the fact that leaf thickness of basal plants is higher. As a result, CO₂ diffusion is limited and thus the rate of photosynthesis will be lower. Although numerous studies have been performed comparing the anatomy and physiology of ferns and angiosperms, angiosperms and gymnosperms or other types of plants, there are few studies that have focused on the comparison of basal plants and more recent plants from the evolutionary point of view. In this study, a comparison is made between several species of ancient angiosperms analyzed with the leaf anatomy and physiological characteristics. Then, another comparison is made of all these species with species of angiosperms that are more recent, evolutionarily speaking. Some results show the first hypothesis exposed, but others suggest an opposite hypothesis, which exposes values of assimilation rate and elevated stomatal conductance when leaf thickness is also high. This fact can suggest that the more thickness of leaf, the more accumulation of photosynthetic pigments and Rubisco, so the values of assimilation rate will be higher, although the values of stomatal conductance and mesophyll conductance are low.

INTRODUCCIÓ

Els vegetals més primitius que es coneixen són aquàtics i el seu pas al medi terrestre i colonització d'aquest es troba entre els esdeveniments més importants de l'evolució de la vida en el nostre planeta. Els primers registres fòssils coneguts, d'uns 400 milions d'anys d'antiguitat, indiquen que el procés de colonització del medi terrestre va tenir lloc entre principi de l'Ordovicià i finals del Silurià mitjà (Díaz *et al.*, 2004). En aquest moment, apareixen les primeres plantes simples com serien els riniòfits i els trimeròfits, molt lligades a ambients humits (Wikström *et al.*, 2001). Les primeres plantes terrestres conegudes com briòfits (molses i hepàtiques) es van adaptar quasi plenament a la vida terrestre, encara que eren dependents de l'aigua. No tenien un sistema conductor comparable al de les plantes vasculares, però a partir de diverses adaptacions varen adquirir una elevada resistència a la dessecació, a més de tenir també la capacitat de regular la transpiració, absorbir, conservar i conduir l'aigua (Díaz *et al.*, 2004). Les plantes primerenques amb presència de llavors van tenir la seva primera aparició en el Devonià tardà i varen permetre el desenvolupament i màxima esplendor de les primeres gimnospermes reconegudes a l'època del Mesozoic fa uns 350 milions d'anys (Raven *et al.*, 2005). Finalment el primer grup de plantes terrestres corresponent a les angiospermes es donà a principis del Cretaci, fa aproximadament 125 milions d'anys, moment en el qual apareixen també enormes quantitats de fòssils d'espècies molt diverses (Willis & McElwain, 2014), assolint així la seva important colonització a la superfície de la terra fins al final del Cretaci (Kenrick & Crane, 1997). Les angiospermes basals no semblen haver estat espècies invasives en les altes latituds; aquest escenari sembla haver canviat més tard amb l'aparició d'angiospermes més recents per a les quals les altes latituds semblen haver ofert un escenari òptim per dominar l'ambient i escampar-se posteriorment (Willis & McElwain, 2014). Aquesta reticència de les angiospermes per dominar la flora a les latituds més altes es va deure, en part, a les limitacions estacionals de llum i humitat que hi ha a altes latituds, limitacions que han d'haver ofert poques oportunitats a les espècies colonitzadores d'angiospermes per reemplaçar l'antiga vegetació, ben establerta i adaptada, de gimnospermes i pteridòfits (Willis i McElwain, 2014). A partir de 1999, diverses anàlisis filogenètiques independents van convergir en arrelaments similars de la filogènia angiosperma. La primera divisió dins les angiospermes vives es va recolzar entre un llinatge que ara inclou un sol gènere, *Amborella*, i totes les altres angiospermes vives (Feild *et al.*, 2003). Les angiospermes són un grup amb gran diversitat de morfologia foliar i són l'únic col·lectiu vegetal que manifesten la presència d'una flor completa, formada per sèpals, pètals, estams i un ovari (Gómez *et al.*, 2012). La característica principal que diferencia les angiospermes de la resta de plantes és l'aparició d'un receptacle constituït per fulles carpelars que formen l'ovari, en l'interior del qual es troben protegits els primordis seminals (Díaz *et al.*, 2004). En el seu augment al domini ecològic, les angiospermes van mostrar una extraordinària flexibilitat evolutiva i desenvolupament evolutiu, fet que va ser possible gràcies a la pertinença

dels diversos òrgans vegetatius i reproductors i fisiologies altament especialitzades en comparació amb altres grups de plantes i falgueres vives (Feild *et al.*, 2003). S'especula que les primeres angiospermes eren petites plantes adaptades a viure a l'ombra, en llocs pertorbats i probablement també humits (Feild *et al.*, 2003). Generalment són plantes aquàtiques herbàcies que habiten a poca profunditat o que es troben arrelades al fons; algunes d'elles poden tenir les fulles molt grans i flotants, i altres són plantes totalment submergides (López *et al.*, 2014). Una de les distincions més considerables entre les primeres angiospermes conegudes i els grups d'angiospermes amb aparició més tardana és l'absència del teixit meristemàtic responsable del creixement en grossor de la planta (Díaz *et al.*, 2004). Les angiospermes primitives no posseeixen aquest teixit, per això la majoria són considerades plantes herbàcies. Generalment les angiospermes més recents evolutivament parlant són plantes de tipus més llenyós o arbustiu, encara que formen el grup més divers pel que fa a la configuració del seu cos vegetatiu, ja que se'n poden trobar de tota la gamma de formes biològiques; de port herbaci (anuals o perennes) fins a grans arbres i arbusts, passant per lianes, mates i altres tipus vegetals (Díaz *et al.*, 2004). Gràcies a aquesta gran diversitat morfològica i fisiològica han pogut colonitzar i estendre's per la gran part d'hàbitats existents del nostre planeta.

En estudis anteriors es pensava que la fotosíntesi era determinada només per la conductància estomàtica (g_s), quedant descuidada la conductància del mesòfil (g_m). No obstant això, un nombre elevat d'evidències han revelat la importància de la difusió del CO_2 a través del mesòfil com a element clau en la regulació de les taxes de fotosíntesi (Nadal & Flexas, 2018). En les angiospermes, les característiques anatòmiques de les fulles tenen un paper important impulsant la fotosíntesi i el potencial de conductància estomàtica (g_s) (Carriquí *et al.*, 2015). A més d'això, s'han obtingut proves en els darrers anys demostrant que els paràmetres anatòmics de les fulles que determinen la longitud i la naturalesa de la via del CO_2 exerceixen un control important sobre el màxim valor de conductància de mesòfil (g_m) que pot mostrar una determinada espècie (Carriquí *et al.*, 2015). En particular, el mesòfil comprèn una sèrie de barreres físiques en quant a la difusió de CO_2 (Flexas *et al.*, 2012). Aquesta difusió a través dels teixits del mesòfil està limitada significativament pel gruix de paret cel·lular i la superfície dels cloroplasts exposada a espais intercel·lulars (Carriquí *et al.*, 2015). Es considera que aquestes "barreres físiques" difereixen per naturalesa i mida entre les diferents fulles, i per tant, pot ser que existeixi una gran variació sobre la conductivitat en difusió de CO_2 en el mesòfil si es té en compte l'anatomia foliar (Flexas *et al.*, 2012). Com que la difusió de CO_2 és un fort determinant per l'assimilació neta, per determinar les característiques subjacents que conformen la fotosíntesi a través i dins de la forma de creixement és important tenir en compte la variabilitat de les conductància estomàtica (g_s) i conductància del mesòfil (g_m) (Nadal & Flexas, 2018). A més d'això, és important saber que en proves recents s'ha suggerit que l'evolució de plantes florals comportaven un fort augment de la capacitat de les fulles per transportar aigua i extreure CO_2 de l'atmosfera (Feild *et al.*, 2011) i que, per tant, se sustenta que la capacitat fotosintètica de les angiospermes es va incrementar molt després del període

del Cretaci en associació a canvis en l'anatomia foliar (Flexas *et al.*, 2012). Així es podria suposar que les angiospermes més basals en comparació a les més recents tenen una taxa fotosintètica menor, i que l'anatomia de les fulles influeix en la conductància del mesòfil.

El present treball té com a objectiu estudiar com varien la fotosíntesi i l'anatomia foliar de 6 espècies d'angiospermes basals entre elles i la posterior comparació amb angiospermes superiors evolutivament parlant.

MATERIAL I MÈTODES

Material vegetal

La realització d'aquest treball ha consistit en una part experimental juntament amb una recerca bibliogràfica d'articles científics relacionats amb l'àmbit estudiat. Com a part experimental s'ha treballat amb un total de 3 rèpliques per 6 espècies, totes pertanyents al grup d'angiospermes basals. Aquestes foren: *Amborella trichopoda*, *Magnolia grandiflora*, *Nuphar lutea*, *Pseudowintera colorata*, *Drymis lanceolata* i *Austrobaileya scandens*. Aquestes espècies es mostrejaren a diferents localitzacions. En concret, *Drymis lanceolata*, *Austrobaileya scandens* i *Pseudowintera colorata* es mostrejaren al "Royal Botanical Garden Edimburgh" (Edimburg, Escòcia, Regne Unit). Per altra part, *Amborella trichopoda* es va mostrejar a Lyon (França), *Nuphar lutea* al campus de la Universitat de les Illes Balears i la darrera espècie, *Magnolia grandiflora*, es va mostrejar a Auckland (Nova Zelanda).

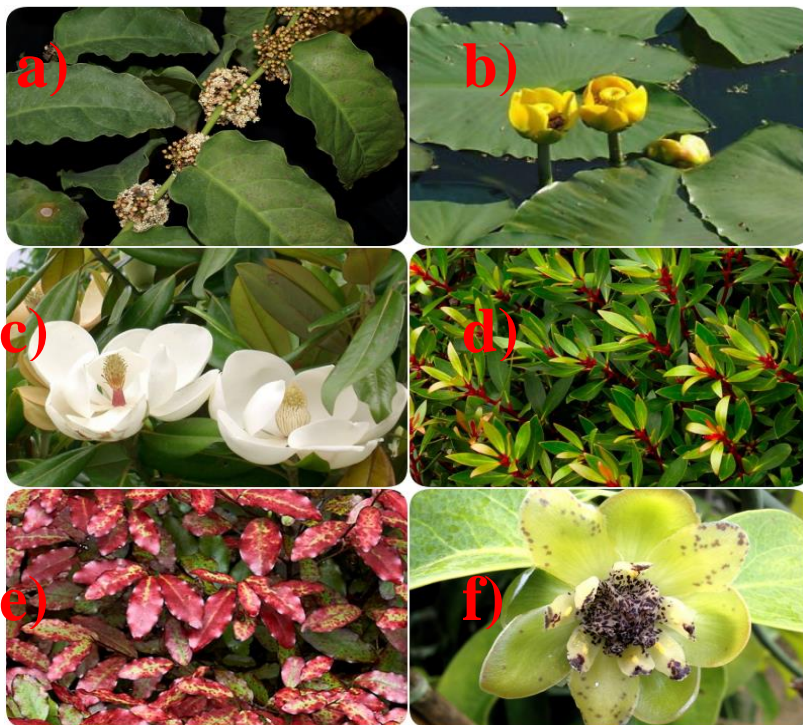


Figura 1: Les 6 espècies d'angiospermes basals estudiades en aquest treball. **a)** *Amborella trichopoda*; **b)** *Nuphar lutea*; **c)** *Magnolia grandiflora*; **d)** *Drymis lanceolata*; **e)** *Pseudowintera colorata*; **f)** *Austrobaileya scandens*

Presa de mesures de paràmetres fisiològics:

De les 6 espècies anteriors, es van seleccionar fulles completament desenvolupades per a la mesura simultània de fluorescència d'intercanvi de gasos per infrarojos (IRGA "Infrared Gas Analyzer") LI-6400XTR, unit al fluoròmetre (Li-6400-40; Li-Cor Inc., Lincoln, NE, EUA) (Carriquí *et al.*, 2015). Les fulles es van subjectar a una cubeta de 2 cm². Després de fixar a l'equip unes condicions concretes per a cada espècie (temperatura, flux, photosynthetic photon flux density - PPF), es van registrar mesures puntuals d'assimilació neta (A_N , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) i de conductància estomàtica al CO_2 (g_s , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) quan l'equip havia arribat a condicions estables (normalment, després de 10-15 minuts). A partir de les dades anteriors, a més, es va poder obtenir la seva eficiència en l'ús de l'aigua (Wue).

Fixació de les mostres anatòmiques i presa de mesures:

Per poder fer l'anàlisi anatòmica de cada mostra per espècie es va procedir a la fixació d'aquestes una vegada les mesures fisiològiques finalitzaren. Per això, es van tallar peces d'1 × 1 mm entre les venes principals de les fulles emprades per l'intercanvi gasós. Les mostres es van fixar amb glutaraldehid 4% i paraformaldehid 2% en un tampó fosfat de 0,1 M (pH 7,4). Posteriorment, per acabar amb el protocol de fixació, les mostres van ser enviades al Servei de microscòpia de la Universitat de Múrcia. Allà, van ser fixades en tetròxid d'osmium 2% durant 2 hores i, en acabar, es van deshidratar en una escala graduada d'etanol. Una vegada els segments ja estaven deshidratats, es van incrustar en resina LR-White i es van solidificar en un forn a 60 °C durant 48 hores. Per seguir amb el procés, es van realitzar talls transversalment amb un ultramicròtom (Leica UC6) de 0,8 micres (μm). Les seccions semifines obtingudes es van tenyir amb blau toluídina 1% i una vegada preparades, es van observar al microscopi òptic Olympus BX60 del Servei de Microscòpia de l'Edifici Científicotècnic de la UIB. Totes les fotografies es van realitzar a 200 augments amb una càmera digital (U-TVO.5XC; Olympus) (Carriquí *et al.*, 2015).

Posteriorment, es va procedir a l'anàlisi de cada mostra anatòmica a partir de la utilització del programa "Image J", un programa de processament d'imatge digital de domini públic programat en Java i desenvolupat per Wayne Rasband al National Institutes of Health (NIH, Bethesda, MD, USA). De cada imatge es van analitzar un total d'11 paràmetres per poder obtenir els valors corresponents per a les mesures morfomètriques. Els paràmetres analitzats foren els següents:

1. Grossor de la fulla ("Leaf thickness" TL): mesura el gruix del conjunt de la fulla format per la cutícula i la paret externa de les dues epidermis.
2. Epidermis superior ("Upper epidermis thickness" TUE): és l'estructura superior més externa de la fulla que envolta el mesòfil.
3. Epidermis inferior ("Lower epidermis thickness" TLE): corresponent a l'estructura inferior més externa de la fulla que envolta el mesòfil.
4. Mesòfil empalissat ("Palisade mesophyl" Tpalisade): part de mesòfil de teixit parenquimàtic caracteritzat per la presència de cèl·lules allargades disposades perpendicularment i riques en cloroplasts.
5. Mesòfil esponjós ("Spongy mesophy" Tspongy): part de mesòfil de teixit parenquimàtic més laxa, les cèl·lules del qual tenen una forma més irregular.
6. Grossor total dels dos tipus de mesòfil (Tmes): es correspon a la suma dels dos tipus de mesòfil sense tenir en compte l'epidermis de la fulla.
7. Àrea de cèl·lules del mesòfil empalissat ("palisade fias") i àrea de cèl·lules del mesòfil esponjós ("spongy fias"): es corresponen a la fracció d'espais aeris intercel·lulars del mesòfil, és a dir, els espais que hi ha entre les diverses cèl·lules. Per poder calcular-ho en primer lloc es mesura el contorn de les cèl·lules per obtenir una àrea representativa de cada espècie en μm^2 i posteriorment es realitza el sumatori de les àrees de tots els espais amb aire intercel·lular trobats en cada mostra. El percentatge d'aire intercel·lular intern es va realitzar mitjançant les mesures del total de l'àrea de la fulla i del contingut d'aire intercel·lular.
8. Capa de cèl·lules del mesòfil empalissat i de l'esponjós (Lpalisade, Lspongy): fa referència al nombre de cèl·lules d'una tira que forma cada tipus de mesòfil.

Cal destacar que cada paràmetre tret s'ha mesurat en longitud (μm) o àrea (μm^2). De cada imatge analitzada s'han realitzat 10 repeticions de mesures longitudinals en diferents parts de la fulla per establir una relació significativa dels valors mediats obtinguts per a cada un dels paràmetres.

Anàlisi estadística:

L'anàlisi estadística de les dades obtingudes en la part experimental s'ha realitzat mitjançant la utilització del software estadístic RStudio. Per fer aquest estudi estadístic i veure diferències significatives entre espècies per tots els paràmetres mesurats, tant fisiològics com anatòmics, s'ha fet un ANOVA d'una via. Per tots aquells valors que mostraven una diferència significativa, quan el p-valor fou inferior a 0,05, s'ha utilitzat el test LSD com a test post-hoc, que permet determinar quines mitjanes difereixen. Posteriorment, s'han utilitzat aquestes mitjanes i s'han fet correlacions entre paràmetres fisiològics i anatòmics, tenint en compte que la correlació és significativa si el p-valor és inferior a 0,05.

RESULTATS

Caracterització de l'anatomia foliar d'angiospermes basals:

Per al cas de trets anatòmics es van observar diferències significatives entre les espècies en tots els paràmetres analitzats a excepció dels valors referents a la capa de cèl·lules del mesòfil empalissat (Lpalisade) i el % Fias total, els quals es troben entre valors de 2,00 – 4,00 i 7,00-19,00 (μm) respectivament, per tant no difereixen en un grau molt elevat entre ells. L'espècie que presenta una major gruixa de fulla és *Magnolia grandiflora*, amb un valor de $403,883 \pm 32,41 \mu\text{m}$ què, a més, es correspon amb l'espècie que presenta els valors més elevats en la majoria dels paràmetres anatòmics. En canvi, *Nuphar lutea* és la que resulta tenir els valors més baixos de tots els paràmetres exceptuant els corresponents a l'àrea de cèl·lules del mesòfil, tant del empalissat ($8,73 \pm 1,26 \mu\text{m}^2$) com de l'esponjós ($15,07 \pm 2,03 \mu\text{m}^2$); en aquest cas *Amborella trichopoda* és la que té els valors mínims ($4,10 \pm 1,47 \mu\text{m}^2$ i $9,51 \pm 3,34 \mu\text{m}^2$, respectivament), inclòs el %Fias amb un valor de 7,33%. Les espècies restants presenten més similitud comparant la majoria dels paràmetres; d'entre aquests destaquen sobre tot la gruixa del mesòfil esponjós (Tspogy) i capa de cèl·lules del mesòfil esponjós (Lspogy). On es veuen major diferències significatives entre espècies és en la gruixa de la fulla, en l'epidermis superior (TUE), epidermis inferior (TLE), mesòfil empalissat (Tpalisade) i grossor total dels dos tipus de mesòfil (Tmes).

Espècies	<i>Amborella trichopoda</i>	<i>Nuphar lutea</i>	<i>Magnolia grandiflora</i>	<i>Pseudowintera colorata</i>	<i>Drymis lanceolata</i>	<i>Austrobaileya scandens</i>
TL (μm)	295,35 \pm 11,95 ^{bc}	100,22 \pm 5,61 ^d	403,88 \pm 32,41 ^a	256,17 \pm 32,79 ^c	332,04 \pm 2,89 ^b	296,11 \pm 15,31 ^{bc}
TUE (μm)	19,58 \pm 2,06 ^a	4,70 \pm 0,37 ^c	12,08 \pm 1,47 ^b	15,53 \pm 0,24 ^b	15,32 \pm 1,61 ^b	15,72 \pm 0,55 ^{ab}
TLE (μm)	19,55 \pm 1,02 ^a	4,56 \pm 0,18 ^d	7,88 \pm 0,51 ^c	13,26 \pm 0,88 ^b	15,31 \pm 0,60 ^b	19,24 \pm 0,90 ^a
Tpalisade (μm)	99,46 \pm 12,33 ^{bc}	46,24 \pm 9,77 ^d	214,94 \pm 20,64 ^a	91,36 \pm 14,85 ^c	137,08 \pm 2,19 ^b	106,98 \pm 18,94 ^{bc}
Tspogy (μm)	159,70 \pm 18,08 ^a	45,37 \pm 11,95 ^b	159,08 \pm 10,19 ^a	150,32 \pm 28,17 ^a	126,98 \pm 4,42 ^a	140,04 \pm 31,63 ^a
Tmes (μm)	259,17 \pm 15,48 ^b	91,61 \pm 5,33 ^c	374,21 \pm 25,74 ^a	241,69 \pm 15,32 ^b	264,06 \pm 3,97 ^b	247,03 \pm 13,55 ^b
Lpalisade (μm)	4,03 \pm 0,18 ^a	3,53 \pm 0,91 ^a	4,40 \pm 0,55 ^a	2,66 \pm 0,03 ^a	3,26 \pm 0,21 ^a	3,26 \pm 0,23 ^a
Lspogy (μm)	7,16 \pm 0,99 ^a	2,80 \pm 0,79 ^b	2,83 \pm 0,36 ^b	4,36 \pm 0,32 ^b	4,10 \pm 0,11 ^b	3,76 \pm 0,56 ^b
Fias palisade (μm^2)	4,10 \pm 1,47 ^c	8,73 \pm 1,26 ^b	11,44 \pm 1,44 ^b	17,46 \pm 1,16 ^a	17,03 \pm 1,05 ^a	11,94 \pm 0,84 ^b
Fias spogy (μm^2)	9,51 \pm 3,34 ^c	15,07 \pm 2,03 ^{bc}	21,37 \pm 1,57 ^a	22,23 \pm 0,93 ^a	22,20 \pm 1,25 ^a	20,75 \pm 0,95 ^{ab}
% Fias	7,33 \pm 2,42 ^a	11,90 \pm 1,63 ^a	16,41 \pm 1,40 ^a	19,85 \pm 0,71 ^a	19,62 \pm 0,36 ^a	16,34 \pm 0,60 ^a

Taula 1: Característiques anatòmiques de cada espècie d'angiosperma basal estudiada. Es mostren els valors mitjans \pm SE per grossor de la fulla (TL), epidermis superior (TUE), epidermis inferior (TLE), mesòfil empalissat (Tpalisade), mesòfil esponjós (Tspongy), grossor total dels dos tipus de mesòfil (Tmes), capa de cèl·lules del mesòfil empalissat (L palisade), capa de cèl·lules del mesòfil esponjós (L spongy), àrea de cèl·lules del mesòfil empalissat (Fias palisade), àrea de cèl·lules del mesòfil esponjós (Fias spongy) i el tant per cent d'espais aeris dels dos tipus de mesòfil (%Fias) en total. Les lletres en superíndex indiquen si hi ha diferència significativa (p-valor <0.05) o no entre diferents espècies segons el test de comparació múltiple LSD fet per a cada paràmetre.

Caracterització dels paràmetres fisiològics d'angiospermes basals:

Si ens fixem en les característiques fisiològiques exposades a la taula 2, es mostren diferències significatives entre les 6 espècies en el cas dels 3 paràmetres fisiològics analitzats. En el cas de l'assimilació neta i l'eficiència en l'ús de l'aigua, les diferències entre els valors són clares. En canvi, els valors de conductància estomàtica en les 6 plantes són molt similars entre ells, a excepció de l'espècie *Nuphar lutea*, que mostra la conductància estomàtica més elevada amb un valor de $0,12 \pm 0,02 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. També es pot observar que aquesta mateixa espècie té el valor més elevat d'assimilació neta ($10,25 \pm 1,59 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) però a la vegada el més baix en quant a eficiència en l'ús de l'aigua ($48,10 \pm 2,30 \mu\text{mol mol}^{-1}$). Com a altres valors importants a destacar, es mostra que *Amborella trichopoda* té el valor mínim d'assimilació neta amb un $2,09 \pm 0,21 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ i que el valor més alt d'eficiència en l'ús de l'aigua el té *Pseudowintera colorata* ($235,91 \pm 13,29 \mu\text{mol mol}^{-1}$).

Espècies	AN ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	gs ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Wue ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)
<i>Amborella trichopoda</i>	2,09 \pm 0,21 ^c	0,02 \pm 0,00 ^b	104,50 \pm 6,29 ^b
<i>Drimys lanceolata</i>	6,14 \pm 0,32 ^{ab}	0,04 \pm 0,00 ^b	153,50 \pm 10,29 ^{ab}
<i>Nuphar lutea</i>	10,25 \pm 1,59 ^a	0,12 \pm 0,02 ^a	48,10 \pm 2,30 ^c
<i>Magnolia grandiflora</i>	4,20 \pm 0,18 ^b	0,05 \pm 0,03 ^b	84,65 \pm 2,19 ^b
<i>Austrobaileya scandens</i>	3,35 \pm 0,41 ^{bc}	0,02 \pm 0,00 ^b	163,10 \pm 9,82 ^{ab}
<i>Pseudowintera colorata</i>	3,63 \pm 0,30 ^b	0,02 \pm 0,00 ^b	235,91 \pm 13,29 ^a

Taula 2: Característiques fisiològiques de cada espècie d'angiosperma basal estudiada. Es mostren els valors mitjans \pm SE d'assimilació neta (A_n), conductància estomàtica (g_s) i eficiència en l'ús de l'aigua (Wue). Les lletres en superíndex indiquen si hi ha diferència significativa (p-valor <0.05) o no entre diferents espècies segons el test de comparació múltiple LSD fet per a cada paràmetre.

Comparació anatòmica i fisiològica d'angiospermes basals:

Al realitzar la correlació entre totes les mesures anatòmiques i fisiològiques, s'han obtingut també correlacions significatives quant a l'anatomia foliar i els paràmetres fisiològics en les 6 angiospermes basals estudiades. Aquestes diferències han quedat representades a la taula 3, de la qual podem destacar com a més significatives la gruixa de la fulla amb el grossor total dels dos tipus de mesòfil ($r^2=0,95$; $p\text{-valor}=0,00058$), el mesòfil esponjós amb l'assimilació neta ($r^2=0,91$; $p\text{-valor}=0,0020$) i el % Fias amb l'àrea de cèl·lules del mesòfil empalissat ($r^2=0,95$; $p\text{-valor}=0,00060$) i amb l'àrea de cèl·lules del mesòfil esponjós ($r^2=0,94$; $p\text{-valor}=0,00087$). A més, també s'han considerat altres valors marcats en negreta i cursiva ja que s'ha mostrat una significació entre ells al ser el $p\text{-valor}<0,05$ a l'hora de realitzar la correlació.

A més d'haver-hi diferències significatives entre els diferents paràmetres d'anatomia foliar, cal destacar que també n'hi ha hagut entre paràmetres anatòmics i els paràmetres fisiològics. La major correlació es dona entre l'assimilació neta amb el mesòfil esponjós ($r^2=0,91$; $p\text{-valor}=0,0020$) i després amb l'epidermis superior ($r^2=0,78$; $p\text{-valor}=0,0124$); la conductància estomàtica al CO_2 amb l'epidermis superior ($r^2=0,86$, $p\text{-valor}= 0,004741$), l'epidermis inferior ($r^2=0,61$; $p\text{-valor}= 0,04086$), mesòfil esponjós ($r^2=0,78$; $p\text{-valor}= 0,012$) i per últim amb l'assimilació neta ($r^2=0,84$; $p\text{-valor}= 0,00626$). En canvi, l'eficiència en l'ús de l'aigua no mostra cap tipus de correlació amb la resta de paràmetres.

	TL	TUE	TLE	Tpalisade	Tspongy	Tmes	Lpalisade	Lspongy	Fias palisade	Fias spongy	% Fias	AN	gs	Wue
TL														
TUE	0,22													
TLE	-0,06	0,78												
Tpalisade	0,78	-0,18	-0,25											
Tspongy	0,66	0,67	0,24	0,23										
Tmes	0,95	0,14	-0,15	0,82	0,70									
Lpalisade	-0,07	-0,24	-0,20	0,13	-0,22	-0,03								
Lspongy	-0,23	0,51	0,41	-0,20	0,04	-0,24	-0,25							
Fias palisade	-0,20	-0,25	-0,25	-0,20	-0,23	-0,21	0,32	-0,01						
Fias spongy	0,47	-0,24	-0,23	-0,01	-0,21	-0,09	-0,02	0,26	0,79					
% Fias	0,13	-0,25	-0,24	-0,12	-0,22	-0,15	0,15	0,10	0,95	0,94				
AN	0,34	0,78	0,47	-0,05	0,91	0,37	-0,23	0,23	-0,25	-0,25	-0,24			
gs	0,29	0,86	0,61	-0,12	0,78	0,24	-0,20	0,15	-0,17	-0,17	-0,24	0,84		
Wue	-0,18	0,15	0,03	-0,24	0,06	-0,19	0,49	-0,20	0,37	0,28	0,12	0,07	0,44	

Taula 3: Matriu de correlacions constituïda pel coeficient de correlació de cada variable. Inclou tots els paràmetres anatòmics i fisiològics que s'han mesurat per les 6 espècies d'angiospermes basals. Els valors marcats en negreta i en cursiva mostren els coeficients de correlació que són significatius (p -valor < 0,05), considerant que els valors entre 0,6 i 0,8 mostren una correlació alta, mentre que els valors entre 0,9-0,99 mostren una correlació quasi perfecta. Abreviatures: grossor de la fulla (TL), epidermis superior (TUE), epidermis inferior (TLE), mesòfil empalissat (Tpalisade), mesòfil esponjós (Tspongy), grossor total dels dos tipus de mesòfil (Tmes), capa de cèl·lules del mesòfil empalissat (Lpalisade), capa de cèl·lules del mesòfil esponjós (Lspongy), àrea de cèl·lules del mesòfil empalissat (Fias palisade), àrea de cèl·lules del mesòfil esponjós (Fias spongy), el tant per cent d'espais aeris dels dos tipus de mesòfil (%Fias) en total, assimilació neta (A_N), conductància estomàtica al CO_2 (g_s) i eficiència en l'ús de l'aigua (Wue).

DISCUSSIÓ

Estudis anteriors han reportat resultats sobre l'anàlisi de l'anatomia foliar i característiques fisiològiques en comparació de falgueres, gimnospermes i diversos tipus d'angiospermes com serien herbàcies, arbres de fulla perenne i caducifòlies. En aquest treball s'han comparat específicament la morfologia i fisiologia de 6 espècies d'angiospermes basals de les quals s'han pogut extreure resultats que difereixen notablement dels altres estudis sobre angiospermes més recents evolutivament parlant.

En primer lloc, els valors de g_s de totes les espècies, a excepció de la que podria ser l'espècie aquàtica *Nuphar lutea* ($0,12 \pm 0,02 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) són molts baixos en comparació a l'estudi de Carriquí *et al.*, (2015) sobre la conductància estomàtica en altres espècies d'angiospermes diferents de les estudiades en aquest treball. Concretament tots els valors són inferiors a $0,1 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, mentre que aquests valors són rars en la major part de gimnospermes. Així, per exemple, en l'estudi de Carriquí *et al.*, (2015), les 7 angiospermes diverses tenen valors superiors a $0,1 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Segueixen el mateix patró els valors d'assimilació neta (A_N). Això és degut a què espècies d'angiospermes més primitives tenen una taxa fotosintètica inferior a les angiospermes més recents. Això podria explicar-se en base a què com més antiga és la línia evolutiva, més gruixada és la paret cel·lular, i per tant, hi ha menor difusió de CO_2 i el nivell de deshidratació és més elevat (Flexas *et al.*, 2012). Generalment la gruixa de la fulla tendeix a limitar la difusió de CO_2 , i, per tant, l'assimilació neta (A_N) (Flexas *et al.*, 2012). Tot i això, en el resultat del present treball, les dues correlacions dels paràmetres anatòmics epidermis superior (TUE) i mesòfil esponjós (Tspongy) amb l'assimilació neta mostren una relació forta i positiva. Aquests resultats podrien suggerir que, en espècies basals d'angiospermes amb valors de fotosíntesi tan baixos com a conseqüència de conductàncies baixes a la difusió, el fet de tenir major gruixa en la epidermis (sobretot en el mesòfil esponjós) podria suposar l'acumulació més elevada de clorofil·la i Rubisco per unitat d'àrea (Roderick *et al.*, 1999) que compensessin lleugerament les baixes conductàncies i, per tant, que els valors de A_N escalin positivament amb la gruixa a pesar de tenir un valors de g_s i g_m molt baixos.

Estudis anteriors revelen que hi ha diferències significatives entre les angiospermes en funció del seu tipus funcional o forma de creixement (Flexas *et al.*, 2012). En l'estudi de Tomás *et al.*, (2013), en el qual hi ha una divisió d'angiospermes segons el seu tipus biològic, es mostra una forta divergència associada sobre tot a paràmetres difusius. El patró general dels valors de A_N i g_s és més alt en plantes herbàcies amb una mitjana de $10,98 \pm 0,5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ i $0,5 \pm 0,02 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivament. Aquest patró va seguit d'arbres de fulla caduca, mentre que arbusts i arbres de fulla perenne són similars a les gimnospermes, amb els valors de A_N i g_s més baixos. Si aquests resultats es comparen amb els del nostre treball, es mostra que *Nuphar lutea* segueix el mateix patró que les plantes herbàcies segons A_N i g_s , mostrant els nivells més elevats ($10,25 \pm 1,59 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ i

0,12±0,02 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivament). Les altres 5 angiospermes basals del nostre estudi són plantes arbustives, i comparant els valors amb els de les espècies d'arbres de Tomás *et al.*, (2013) es pot extreure que els valors no difereixen en elevat grau. En concret, les mitjanes de A_N i g_s de les angiospermes arbustives d'aquest treball són 3,88±0,28 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ i 0,03±0,01 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ respectivament. Els arbres de fulla caduca de l'estudi de Tomás *et al.*, (2013) tenen una mitjana de A_N de 4,40±0,84 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ i una mitjana de g_s de 0,06±0,01 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. En canvi, els arbres perennes tenen una A_N de 3,24±0,46 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ i un valor de g_s de 0,05±0,01 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}$. Si es fa la comparació entre tots aquests valors, s'observa que la mitjana d'angiospermes basals de tipus arbustiu per a l'assimilació neta és més elevada que en les espècies de fulla perenne, però és inferior als de fulla caduca. Aquesta diferència és mínima, ja que només difereixen per decimals. En canvi, per als valors de conductància estomàtica, les plantes del nostre estudi presenten la mitjana més baixa en comparació als dos tipus d'arbusts estudiats a Tomás *et al.*, (2013). Aquestes diferències entre grups de plantes (de valors més baixos en espècies llenyoses i arbustives a més alts a espècies d'herbàcies) poden estar fortament relacionades amb el gruix de la paret cel·lular de la fulla i es podria explicar pel desenvolupament de la venació de les fulles entre les plantes terrestres (Nadal & Flexas, 2018). Per tant, se sustenta que les plantes herbàcies podrien tenir la paret cel·lular de la fulla més fina, fet que permetria una difusió de CO_2 més elevada i, com a conseqüència, un augment de la taxa fotosintètica. En canvi, l'eficiència en l'ús de l'aigua (W_{ue}) pot donar-se a diferents nivells; des de la planta sencera fins a nivell foliar (Nadal & Flexas, 2018). A nivell de fulla, s'han comparat els resultats de les nostres espècies basals amb els resultats de l'estudi de Nadal & Flexas (2018), on s'ha mostrat un alt grau de variabilitat en W_{ue} dins cada grup. En el nostre estudi, l'espècie amb un W_{ue} més elevat és *Pseudowintera colorata* (235,91±13,29 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) i la que té el valor més baix és *Nuphar lutea* (48,10±2,30 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). Els valors més alts corresponen a espècies d'angiospermes més llenyoses, més semblant a gimnospermes, i els més baixos corresponen a espècies herbàcies, com en el nostre cas seria *Nuphar lutea*. No obstant això, la gamma existent entre les espècies indica que aquestes operen diferentment per sobre de la relació A_N - g_s (W_{ue}), és a dir, a més de dependre de la forma de creixement també podrien influir les condicions ambientals a les qual estan exposades (Nadal & Flexas, 2018).

CONCLUSIÓ

S'ha realitzat un estudi en què s'han comparat específicament els trets anatòmics i fisiològics de 6 tipus d'angiospermes primitives i, posteriorment, s'ha fet una comparació més general d'aquestes amb altres espècies d'angiospermes més "modernes" evolutivament parlant dels següents estudis: Carriquí *et al.*, (2015); Tomás *et al.*, (2013) i Nadal & Flexas (2018). Es destaca que les característiques anatòmiques de les fulles són trets fonamentals i adaptatius que influeixen en la fisiologia de la planta quant fotosíntesi, conductància estomàtica i eficiència en l'ús de l'aigua. S'ha extret que les angiospermes herbàcies presenten majors nivells quant a valors de taxa fotosintètica i conductància estomàtica a diferència de les plantes llenyoses o de tipus arbustiu. A més, també es pot destacar que les angiospermes primitives presenten nivells inferiors de fotosíntesi i conductància estomàtica a diferència d'angiospermes recents. Tots aquests fets es deuen a què el grossor foliar influeix en els trets fisiològics; com més gruixada és la paret de l'estructura de la fulla, més limitada es troba la difusió de CO₂ i per tant la taxa de fotosíntesi serà menor. No obstant això, la correlació positiva de dos paràmetres anatòmics amb l'assimilació neta podria suggerir que el fet de tenir una paret foliar més gruixada podria significar l'acumulació de pigments fotosintètics o nivells més elevats de Rubisco en el mesòfil, i per tant, tenir una certa compensació en l'assimilació neta. Per poder demostrar aquesta hipòtesis, seria necessari la realització de més anàlisis anatòmiques i fisiològiques d'angiospermes primitives i fer una comparació entre ambdós estudis.

AGRAÏMENTS

En primer lloc m'agradaria donar les gràcies a Margalida Roig del departament de Fisiologia Vegetal de la Universitat de les Illes Balears per la seva ajuda, dedicació, esforç i per guiar-me de la millor manera en aquest treball. Per resoldre'm tots els dubtes, estar pendent de mi en qualsevol moment, proporcionar-me tota la informació possible i el material de laboratori adequat però sobre tot per la paciència que ha tingut amb mi durant tota la realització del treball. Agrair-li a Doctor Jaume Flexas Sans que hagi fet un seguiment i m'hagi resolt també tots els dubtes per poder realitzar el treball de la millor forma possible. També a les persones que han estat amb mi durant tota la meva formació com a biòloga, a les meves companyes de classe Maria Amengual, Xisca Munar i Marcela Julià que han fet que la carrera sigui més amena i en especial a la meva mare Marga Altés, que no ha deixat mai que de recolzar-me des de que vaig començar.

REFERÈNCIES

- Carriquí, M.; Cabrera, H. M.; Conesa, M. À.; Coopman, R. E.; Douthe, C.; Gago, J.; Galle, A.; Galmés, J.; Ribas-Carbó, M.; Tomás, M.; Flexas, J. (2015).** Diffusional limitations explain the lower photosynthetic capacity of ferns as compared with angiosperms in a common garden study. *Plant, cell & environment*, 38(3), 448-460.
- Díaz González, T. E., Fernández-Carvajal Álvarez, C., & Fernández Prieto, J. A. (2004).** *Curso de botánica*. Trea, D58DIA
- Flexas, J., Barbour, M. M., Brendel, O., Cabrera, H. M., Carriquí, M., Díaz-Espejo, A., ... Warren, C. R. (2012).** Mesophyll diffusion conductance to CO₂: An unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Science*, 193-194, 70–84.
- Flexas, J., Ribas-Carbó M., Diaz-Espejo, A., Galmes, J., & Medrano, H. (2008).** Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. *Plant, cell & environment*, 31(5), 602-621.
- Feild, T. S., Brodribb, T. J., Iglesias, A., Chatelet, D. S., Baresch, A., Upchurch, G. R., ... & Jaramillo, C. (2011).** Fossil evidence for Cretaceous escalation in angiosperm leaf vein evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(20), 8363-8366.
- Feild, T. S., Arens, N. C., & Dawson, T. E. (2003).** *The Ancestral Ecology of Angiosperms: Emerging Perspectives from Extant Basal Lineages*. *International Journal of Plant Sciences*, 164(S3), S129–S142.
- Gómez, P. V. (2012).** Angiospermas. In *El árbol de la vida: sistemática y evolución de los seres vivos*, 114-123.
- Kenrick, P., & Crane, P. R. (1997).** The origin and early evolution of plants on land. *Nature*, 389(6646), 33.
- Medrano, H., Bota, J., Cifre, J., Flexas, J., Ribas-Carbó, M., & Gulías, J. (2007).** Eficiencia en el uso del agua por las plantas. *Investigaciones geográficas (Esp)*, (43), 63-84.
- Nadal, M., & Flexas, J. (2019).** Variation in photosynthetic characteristics with growth form in a water-limited scenario: Implications for assimilation rates and water use efficiency in crops. *Agricultural Water Management*, 216, 457-472.
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (2005).** *Biology of plants*. Macmillan.
- Roderick, M. L., Berry, S. L., Saunders, A. R., & Noble, I. R. (1999).** On the relationship between the composition, morphology and function of leaves. *Functional Ecology*, 13(5), 696-710.
- Stemans, P., Le Hérisse, A., Melvin, J., Miller, M. A., Paris, F., Verniers, J., & Wellman, C. H. (2009).** Origin and radiation of the earliest vascular land plants. *Science*, 324(5925), 353-353.
- Tomás, M.; Flexas, J.; Copolovicil, L.; Galmés, J.; Hallik, L.; Medrano, H.; Ribas-Carbó, M.; Tosens, T.; Vislap, V.; Niinemets, Ü. (2013).** Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO₂ across species: quantitative limitations and scaling up by models. *Journal of Experimental Botany*. (64), 2269-2281.

Tosens, T., Nishida, K., Gago, J., Coopman, R. E., Cabrera, H. M., Carriquí, M., Flexas, J. (2015). The photosynthetic capacity in 35 ferns and fern allies: mesophyll CO₂ diffusion as a key trait. *New Phytologist*, 209(4), 1576–1590.

UNNE 2013. GIMNOSPERMAS. Guía de Consulta Diversidad Vegetal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Argentina.

Wikström, N., Savolainen, V., & Chase, M. W. (2001). Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1482), 2211-2220.

Willis, K., & McElwain, J. (2014). *The evolution of plants*. Oxford University Press.