



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de Ciències

**Memòria del Treball de Fi de Grau**

# Estudio de la ultraestructura de plantas no vasculares (musgos, hepáticas y antocerotas) en relación a su capacidad fotosintética

Juan José Melis Cerrato

**Grau de Biologia**

Any acadèmic 2013-14

DNI del alumno: 41586272-H

Trabajo tutelado por Jaume Flexas Sans

Departamento de Biología

El autor no autoriza el acceso al público de este Trabajo de Fin de Grado.

Palabras clave:

Briófitas, fotosíntesis, anatomía foliar, conductancia del mesófilo, distribución de los cloroplastos, grosor de la pared celular.

# Índice

Agradecimientos.	. . . . .	Pág. 4
Resumen	. . . . .	Pág. 5
Introducción	. . . . .	Pág. 6
Material y métodos	. . . . .	Pág. 7
Resultados	. . . . .	Pág. 9
Discusión	. . . . .	Pág. 16
Conclusiones	. . . . .	Pág. 17
Bibliografía	. . . . .	Pág. 18

## **Agradecimientos**

Gracias a la elaboración de este trabajo he podido introducirme dentro de uno de los campos más importantes de la ciencia, la investigación, y no sólo eso, sino experimentar las dos caras de ésta: la parte amarga por ver que un experimento no avanza y la cara contraria al ver finalizado un proyecto y comprobar que los resultados corresponden a lo que se había planteado en un principio. Además, el hecho de realizar este estudio tan novedoso en el ámbito de la fisiología vegetal y dentro de uno de los grupos de investigación más importantes en este campo, me ha supuesto un reto y un orgullo.

Este estudio no habría sido posible sin la ayuda que me han brindado todos y cada uno de los integrantes del Grup de Recerca en Biologia de les Plantes en Condicions Mediterrànies a los que les he pedido ayuda, desde mi tutor el Dr. Jaume Flexas hasta el alumno del máster Marc Carriquí, sin olvidar a los Dres. Jorge Gago, Cyril Douthe y a Magdalena Tomás. Sin olvidarme de amigos y familiares que han aportado su pequeño grano de arena al apoyarme y animarme en los momentos más duros del trabajo: sin este aporte tampoco hubiese sido posible este trabajo.

Quiero agradecer también al Dr. Ferran Hierro, Universitat de les Illes Balears (Serveis Científic-Tècnics) y a la Universitat de Valencia (Secció Microscopia Electrónica, SCSIE) el apoyo técnico en los análisis de microscopía.

## Resumen

Las Briófitas son los representantes vivos más cercanos a las primeras plantas que colonizaron el medio terrestre. Este grupo de organismos, a diferencia del resto de plantas terrestres, no poseen vascularización ni estomas, pero a pesar de estas limitaciones adaptativas, estos organismos poseen estrategias útiles para poder mantener un balance de carbono positivo a lo largo de su vida y así poder prosperar en un determinado entorno. En los pocos estudios realizados podemos suponer que las Briófitas presentan menores tasas fotosintéticas en comparación con el resto de plantas terrestres, pero más allá de este conocimiento son escasos los estudios sobre su fisiología, debido principalmente a la gran dificultad que representa realizar este tipo de estudios en estos organismos debido a sus características fenológicas, así como de tamaño y morfología. En este sentido, el presente trabajo ha consistido en la obtención de parámetros fisiológicos, en particular las tasas de fotosíntesis y la conductancia del mesófilo ( $g_m$ ), este último a partir de análisis morfoestructurales de las hojas, y hacer una comparativa de estos parámetros con el resto de plantas terrestres. Para ello se seleccionaron 14 especies de Briófitas, 6 Musgos, 6 Hepáticas y 2 Antocerotas. Se observaron diferencias significativas en los parámetros medidos, tanto entre especies, como entre los tres grupos estudiados, como entre éstos y diferentes grupos de plantas vasculares. Este trabajo aporta una clara evidencia sobre la existencia de una tendencia evolutiva hacia un aumento en la conductancia del mesófilo y la capacidad fotosintética a lo largo de la filogenia de las plantas terrestres, la cual se relaciona con una disminución del grosor de la pared celular y un incremento de la superficie cloroplástica expuesta a los espacios aéreos intercelulares por superficie foliar.

## Introducción

Tras la colonización por las plantas del medio terrestre, hace 500 millones de años, las Briófitas fueron el primer grupo de organismos en evolucionar, por lo que se consideran los representantes vivos más cercanos de aquellas plantas que evolucionaron a partir del linaje Mesostigma, a través de las Coleochaetales y las Charales (Lewis & McCourt 2004; Turmel et al 2007). Los Briófitas se separaron tempranamente del resto de las plantas terrestres dando lugar a tres linajes diferenciados: musgos, hepáticas y antocerotas (Renzaglia et al. 2007). A pesar de tener una diversificación escasa, si las comparamos con las embriofitas, contribuyen de manera significativa al almacenamiento mundial de carbono, de manera muy especial en ecosistemas de bosques boreales y turberas (Bisbee et al. 2001; Goulden & Crill 1997; Clymo & Hayward 1982; Campbell et al 2000; Gunnarsson 2005).

Estos organismos, desde el punto de vista adaptativo, son muy diferentes de las plantas vasculares, aunque ambas representan dos soluciones útiles para poder vivir en el medio terrestre, donde el abastecimiento de agua y su demanda por parte de la atmósfera constituyen la principal limitación para la vida vegetal. Por un lado, las adaptaciones más importantes de las plantas vasculares consisten en su propia vascularización, que les permite una mejor adquisición y distribución del agua del suelo, y en poseer unas estructuras celulares de apertura regulable (estomas) en las hojas y otras estructuras fotosintéticas, que les permiten una muy buena regulación a la hora de intercambiar gases con el exterior, además de reducir al mínimo las pérdidas de agua. Por el contrario, las Briófitas son especies no vasculares y sin estomas, que absorben y pierden agua muy fácilmente a través de sus membranas celulares (Sveinbjörnsson & Oechel, 1992). Para mantener los tejidos con un turgor estable, poseen en el exterior de estos una fina película de agua (Proctor, 2000). Pero esta capa de agua supone un factor limitante para la difusión del CO<sub>2</sub> hacia los cloroplastos. La extensión de esta capa está controlada por la disponibilidad de agua, la velocidad del viento, la temperatura del aire y la humedad relativa, pero también por la estructura de las hojas (Silvola, 1990; Rice & Giles, 1996; Williams & Flanagan, 1996; Meyer et al, 2008). Otras especies de Briófitas, por el contrario, han adoptado la estrategia de ser tolerantes a la desecación, pudiendo perder el turgor celular y su contenido hídrico sin sufrir daños, recuperándose al volver a tener disponibilidad de agua (Proctor, 2000).

Con independencia de la tolerancia a la desecación, la capacidad que tienen las plantas para poder prosperar en un determinado entorno viene determinada por la posibilidad de mantener un balance de carbono positivo a lo largo de su vida. Esto a su vez depende en gran parte de las características anatómicas de las hojas u otros órganos fotosintéticos, como la máxima capacidad fotosintética por unidad de masa seca, la vida útil de las hojas, el nitrógeno y el contenido de fósforo por peso en seco, y la respiración (Wright et al., 2004, Niinemets et al., 2009; Scafaro et al., 2011; Terashima et al., 2011).

Actualmente existen estudios realizados sobre plantas vasculares que demuestran que la conductancia del mesófilo para el CO<sub>2</sub> ( $g_m$ ) – definida como la facilidad de difusión del CO<sub>2</sub> por el mesófilo, desde la cavidad subestomática hasta el lugar de carboxilación en los cloroplastos (Flexas et al (2008, 2012) - es finita y variable, siendo uno de los principales factores limitantes de la fotosíntesis (Niinemets et al., 2009). Además,  $g_m$  está íntimamente relacionada con las propiedades foliares de las plantas (Niinemets et al, 2009; Tosens et al, 2012a). En particular, se ha demostrado que hojas con una estructura más robustas, es decir con mayor biomasa tisular, presentan tasas fotosintéticas menores, debido a la gran reducción de CO<sub>2</sub> en las cavidades

subestomáticas ( $C_i$ ) y de los cloroplastos ( $C_c$ ),  $C_i-C_c$ , lo que demuestra que la capacidad fotosintética está limitada por  $g_m$  (Flexas et al., 2008, Niinemets et al., 2009).

Los valores máximos de  $g_m$  han sido estimados para más de un centenar de especies, revelando la existencia de un cierto patrón filogenético/evolutivo en este parámetro. Los valores máximos se han encontrado en angiospermas no leñosas, destacando, dentro del grupo de los espermatofitos, las gramíneas, y los valores más bajos se han encontrado en angiospermas leñosas y, sobre todo, en coníferas y helechos. Los escasos datos disponibles para Briófitas, más concretamente en algunas especies de hepáticas, sugieren valores de  $g_m$  mucho más bajos que en plantas vasculares (Meyer et al. 2008). Este incremento en los valores medios de  $g_m$  a lo largo de la evolución o escala filogenética podría estar relacionado con cambios en la morfología foliar (Feild et al. 2011). Sin embargo, y a pesar de observarse este patrón evolutivo, no se puede extraer ninguna conclusión general debido a que hay un vacío significativo en el conocimiento de la tendencia filogenética de  $g_m$ , ya que la gran mayoría de los valores disponibles son para Espermatofitas (angiospermas y gimnospermas), con muy pocos datos para las hepáticas, antocerotas y helechos (Flexas et al. 2012, Volkova et al. 2009; Gago et al., 2013), además de haber una absoluta falta de conocimiento sobre los valores de  $g_m$  en grupos intermedios como musgos y licófitas. La ausencia de datos en estos grupos deriva, en gran parte, de la dificultad que entraña su medida, debido a que la morfología de estos organismos no se adapta al diseño de las cámaras comerciales disponibles para la medida de la fotosíntesis.

Estudios realizados por Tomás et al. (2013), entre otros, demuestran que  $g_m$  está fuertemente correlacionada con la superficie de cloroplastos expuestos a espacios intercelulares en relación al área foliar total ( $Sc/S$ ) y con el espesor de la pared celular ( $T_{cw}$ ), pudiendo explicar estos dos factores más del 50% de la variabilidad en  $g_m$  (Evans et al., 2009; Terashima et al, 2011.; Tosens et al., 2012b). Sin embargo, dependiendo de la estructura anatómica de las hojas, la importancia de  $g_m$  en la limitación de la fotosíntesis y en la difusión de  $CO_2$  varía entre especies.

En el caso de las Briófitas estudiadas se ha observado que poseen paredes celulares muy gruesas en comparación con plantas superiores, siendo otros parámetros morfo-anatómicos como  $Sc/S$  desconocidos en estas especies (Waite and Sack., 2010) Estas características podrían implicar una baja capacidad para  $g_m$  y fotosíntesis en este grupo, explicando así el crecimiento lento de este grupo de organismos y confirmando la tendencia evolutiva de las especies hacia una mayor  $g_m$ . Es por ello que los objetivos del presente trabajo son básicamente dos:

1. Realizar un estudio detallado de los rasgos anatómicos que pueden jugar un papel importante sobre  $g_m$  en un grupo de especies de Briófitas, aplicando un modelo para estimar los valores máximos esperables de  $g_m$  para este grupo de especies.
2. Evidenciar si existe un patrón evolutivo, en los rasgos anatómicos y fisiológicos medidos en este grupo de especies, al compararlo con otros grupos filogenéticamente más evolucionados.

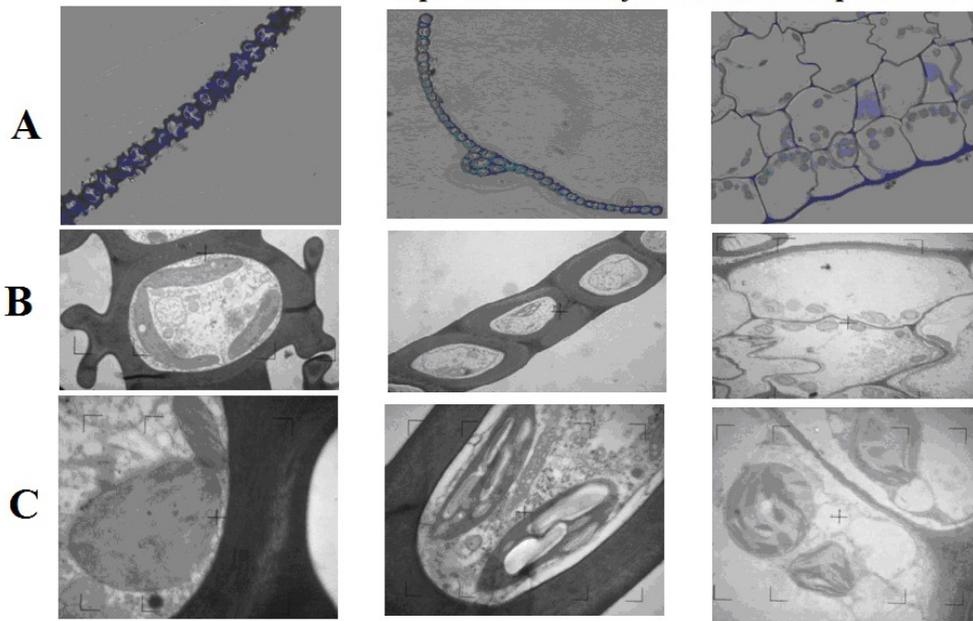
## **Material y métodos**

### **Medidas anatómicas**

Se cortaron piezas de 1x1 mm entre las venas principales de las hojas para medidas anatómicas. El material foliar fue rápidamente fijado al vacío con glutaraldehído al 4% y paraformaldehído al 2% en un tampón fosfato 0.1M (pH 7.2). Posteriormente, las muestras fueron fijadas en tetraóxido de osmio al 1% durante una hora y se deshidratan en una serie graduada de etanol seguido de lavado tres veces en óxido de propileno. Los segmentos deshidratados fueron embebidos en resina de Spurr (Monocomp Instrumentación, Madrid, España) y se solidificaron en un horno a 60 ° C durante 48 h. Las secciones de cortes semifinos (0.8 micras) y ultrafinos (90 nm) fueron cortados con un ultramicrotomo (modelo Reichert & Jung Ultracut E). Las secciones semifinos se tiñeron con azul de toluidina al 1% y se observaron bajo el microscopio óptico Olympus BX60. Las fotografías fueron tomadas a 200x y 500 aumentos con una cámara digital (U-TVO.5XC, Olympus) para medir el grosor de la hoja, el grosor de la epidermis superior e inferior y el grosor del mesófilo (Figura 1A) con ImageJ (ImageJ; Wayne Rasband / NIH, Bethesda, MD, EE.UU.), en el caso de solo tener una sola capa el grosor de la hoja se considera como grosor del mesófilo. Las secciones ultrafinas para microscopía electrónica de transmisión (TEM H600, Hitachi) fueron contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las fotografías fueron tomadas a 2000x, 3000 y 6000 aumentos (Figura 1B) para medir el tamaño de las células del mesófilo y el área de superficie del mesófilo y cloroplástica expuesta en los espacios aéreos intercelulares por área de hoja, Sm/S y Sc/S. El factor de corrección de curvatura celular se midió y calculó para cada especie de acuerdo con Thain (1983), haciendo un promedio de la relación ancho-longitud de 3-5 células para 4 campos de vista diferentes para cada fracción tisular. Todos los parámetros fueron analizados en de cuatro a seis campos de vista diferentes y en tres secciones diferentes. Para Sm/S y Sc/S se calcularon medias ponderadas a partir de las fracciones de volumen tisular.

El grosor de la pared celular del mesófilo se midió a 20000x aumentos (Figura 1C) en de 10 campos de vista diferentes y 6 secciones diferentes por réplica de cada especie. Las micrografías fueron seleccionadas al azar en cada sección. Se realizaron diez medidas por réplica para cada característica anatómica: grosor y longitud de los cloroplastos (Tchl y Lchl), distancia entre cloroplastos y distancia de los cloroplastos a la pared celular (Tcyt). Las micrografías fueron seleccionadas al azar en cada sección. Las imágenes fueron analizadas con el software de análisis de imágenes ImageJ (ImageJ; Wayne Rasband / NIH, Bethesda, MD, EE.UU.).

*Pentastichella pentasticha* *Lepidozia chordulifera* *Antocerota* pendiente de clasificar



**Figura 1** Selección de fotografías de secciones transversales semifinas a 200-500x aumentos (A) y de secciones transversales ultrafinas a 1000-6000X (B) y 20000x aumentos (C) de hojas de algunas de las especies estudiadas.

Medidas fisiológicas

Las medidas de  $g_m$ , solo teniendo en cuenta las características anatómicas de las hojas, fueron realizadas para todas las especies, siguiendo los procedimientos descritos con detalle por Tomás et al. (2013).

Estadística

En los análisis de las relaciones entre las características estructurales y fisiológicas de la hoja se utilizaron medias de tres o dos repeticiones por especie. Los coeficientes de regresión y las correlaciones fueron obtenidos a partir del paquete de software Sigma Plot 16 (SPSS; Chicago, IL, USA). El análisis univariante de la varianza (ANOVA) fue realizado para revelar diferencias entre las especies y los tipos (helechos y fanerógamas) en las características estudiadas. Las diferencias entre las medias fueron reveladas mediante análisis de Tukey ( $P < 0,05$ ). Se determinaron matrices de correlación de Pearson para el conjunto de especies y para cada tipo para conocer la estructura correlativa de los diferentes parámetros; para una evaluación conservativa de las correlaciones de parámetros, éstas sólo fueron consideradas como significativas cuando  $P < 0,05$  y  $P < 0,01$ . Estos análisis fueron realizados con el paquete de software estadístico SPSS IBM 19.0 (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.).

## Resultados

### Medidas anatómicas

La gran mayoría de los caracteres estructurales foliares medidos para las especies de antocerotas, hepáticas y musgos presentan diferencias significativas entre los tres grupos, exceptuando los parámetros Sc/Sm, Tcw, Lchl y Tch1, en donde solo se observan diferencias significativas entre las antocerotas y el resto. Al comparar los valores de la pared celular, estos son 1.64 veces más elevados en antocerotas que en hepáticas, y 1.79 veces en antocerotas que en musgos (Tabla 1). Mientras que si se compara la ratio Sc/Sm entre antocerotas y el resto de los grupos, los valores son casi 6 veces mayores en hepáticas y musgos. Y respecto a los valores de longitud y grosor de los cloroplastos, estos son entre 4-6 veces elevados en antocerotas que en musgos y hepáticas.

De este modo el grosor del mesófilo presenta diferencia entre los grupos, con unos extremos muy marcados entre las antocerotas (en el cual se encuentran los valores más elevado, con 169.83  $\mu\text{m}$  de media) y los otros dos grupos (con valores medios de 21.73  $\mu\text{m}$  para hepáticas y 12.99  $\mu\text{m}$  para musgos). También el área de la superficie del mesófilo expuesta a espacio aéreo intercelular (Sm/S) y la superficie cloroplástica expuesta en los espacios aéreos intercelulares por área de hoja (Sc/S), presentan diferencias entre grupos, observando, en ambos parámetros, los extremos entre la especie *Neckera* spp (con valores de 0.15 y 0.04  $\mu\text{m}$  para Sm/S y Sc/S) y *Dendroligotrichum dendroides* (con valores de 2.36 y 1.08  $\mu\text{m}$  para Sm/S y Sc/S). Comparando sólo la media de los tres grupos, los valores más elevados se encuentran en antocerotas, seguidos de musgos y hepáticas (Tabla 1).

### Estimaciones fisiológicas

A partir de los parámetros anatómicos se ha podido estimar los valores de  $g_m$  máximos teóricos en todas las especies estudiadas. Entre los tres grupos de organismos estudiados sólo se observan diferencias significativas entre los musgos y los otros dos grupos (antocerotas y hepáticas). Prácticamente los valores de  $g_m$  en musgos son 13.6 veces mayor al resto de grupos, encontrando los extremos entre *Neckera* spp y *Dendroligotrichum dendroides* (0,796 y 140,242  $\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  respectivamente), teniendo este último valores típicos de plantas superiores (Flexas *et al.*, 2012) (Tabla2).

**Tabla 1.** Características anatómicas medidas en todas las especies. Valores de las medias  $\pm$  SE del grosor del mesófilo (TM), área de la superficie del mesófilo expuesta a espacio aéreo intercelular (Sm/S), área de la superficie cloroplástica expuesta en el espacio aéreo intercelular (Sc/S), ratio Sc/Sm, grosor de la pared celular (Tcw), distancia entre el cloroplasto y la pared celular (Tcyt) y grosor y longitud de los cloroplastos (Tchl y Lchl) para todas las especies estudiadas y para los dos grupos diferenciados.

Especies	TM ( $\mu\text{m}$ )	Sm/S ( $\mu\text{m}$ )	Sc/S ( $\mu\text{m}$ )	Sc/Sm ( $\mu\text{m}$ )	Tcw ( $\mu\text{m}$ )	Tcyt ( $\mu\text{m}$ )	Lchl ( $\mu\text{m}$ )	Tchl ( $\mu\text{m}$ )
<b>Antocerotas</b>								
<i>A.p.c</i>	203,31 $\pm$ 34,67 <sup>a</sup>	1,56 $\pm$ 0,11 <sup>d</sup>	0,06 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	3,54 $\pm$ 0,22 <sup>c</sup>	0,81 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	5,28 $\pm$ 0,47 <sup>b</sup>	8,61 $\pm$ 0,62 <sup>b</sup>
<i>Megaceros fuegiensis</i>	136,36 $\pm$ 39,6 <sup>a</sup>	1,01 $\pm$ 0,05 <sup>bcd</sup>	0,1 $\pm$ 0,02 <sup>bcd</sup>	0,09 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	3,14 $\pm$ 0,11 <sup>bc</sup>	1,57 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>	7,12 $\pm$ 0,87 <sup>b</sup>	17,51 $\pm$ 1,74 <sup>c</sup>
Media	<b>169,83<math>\pm</math>33,472<sup>a</sup></b>	<b>1,29<math>\pm</math>0,27<sup>a</sup></b>	<b>0,08<math>\pm</math>0,02<sup>a</sup></b>	<b>0,0631<math>\pm</math>0,0317<sup>a</sup></b>	<b>3,23<math>\pm</math>0,16<sup>a</sup></b>	<b>1,189<math>\pm</math>0,38<sup>a</sup></b>	<b>6,19<math>\pm</math>0,92<sup>a</sup></b>	<b>13,06<math>\pm</math>4,45<sup>a</sup></b>
<b>Hepáticas</b>								
<i>Lepidozia chordulifera</i>	8,28 $\pm$ 0,246 <sup>a</sup>	0,28 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,07 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,24 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	1,14 $\pm$ 0,08 <sup>ab</sup>	0,16 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	1,07 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	2,88 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>
<i>H.p.c 1</i>	25,47 $\pm$ 2,09 <sup>a</sup>	0,58 $\pm$ 0,02 <sup>abc</sup>	0,26 $\pm$ 0,02 <sup>abc</sup>	0,42 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	2,27 $\pm$ 0,2 <sup>abc</sup>	0,1 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	1,41 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	2,69 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>
<i>Symphyogyna hymenophyllum</i>	51,06 $\pm$ 3,64 <sup>a</sup>	0,46 $\pm$ 0,07 <sup>abc</sup>	0,2 $\pm$ 0,03 <sup>abc</sup>	0,45 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	2,12 $\pm$ 0,05 <sup>abc</sup>	0,05 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	1,25 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	4,25 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>
<i>Radula diversifolia</i>	16,16 $\pm$ 1,21 <sup>a</sup>	0,49 $\pm$ 0,04 <sup>abc</sup>	0,24 $\pm$ 0,01 <sup>abc</sup>	0,51 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	1,92 $\pm$ 0,24 <sup>abc</sup>	0,08 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,93 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	2,85 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>
<i>H.p.c 2</i>	21,14 $\pm$ 3,28 <sup>a</sup>	0,44 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>	0,18 $\pm$ 0,02 <sup>abc</sup>	0,34 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	1,25 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	0,1 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	1,14 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	3,19 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>
<i>Neckera spp</i>	8,26 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	0,15 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	0,24 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	2,48 $\pm$ 0,19 <sup>abc</sup>	0,14 $\pm$ 0,013 <sup>a</sup>	0,93 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	2,72 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>
Media	<b>21,73<math>\pm</math>6,6<sup>b</sup></b>	<b>0,4<math>\pm</math>0,06<sup>b</sup></b>	<b>0,16<math>\pm</math>0,035<sup>a</sup></b>	<b>0,38<math>\pm</math>0,05<sup>b</sup></b>	<b>2,01<math>\pm</math>0,19<sup>b</sup></b>	<b>0,1023<math>\pm</math>0,016<sup>b</sup></b>	<b>1,12<math>\pm</math>0,08<sup>b</sup></b>	<b>3,1<math>\pm</math>0,24<sup>b</sup></b>
<b>Musgos</b>								
<i>Pentastichella pentasticha</i>	11,87 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	0,45 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>	0,23 $\pm$ 0,03 <sup>abc</sup>	0,48 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	1,36 $\pm$ 0,14 <sup>ab</sup>	0,32 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,96 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	3,04 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>
<i>Dicranoma imponens</i>	10,86 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	0,31 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,18 $\pm$ 0,015 <sup>ab</sup>	0,38 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	2,73 $\pm$ 0,12 <sup>abc</sup>	0,08 $\pm$ 0,015 <sup>a</sup>	0,84 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	2,81 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>
<i>Weymouthia mollis</i>	7,17 $\pm$ 0,289 <sup>a</sup>	0,23 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,07 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,25 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	1,76 $\pm$ 0,08 <sup>abc</sup>	0,12 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,65 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	3,89 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>
<i>Weymouthia cochlearifolia</i>	8,99 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>	0,27 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,06 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	0,23 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	2,67 $\pm$ 0,11 <sup>abc</sup>	0,08 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,99 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	2,54 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>
<i>Breutelia suplicata</i>	9,26 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup>	0,22 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,1 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,43 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	1,43 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	0,13 $\pm$ 0,015 <sup>a</sup>	1,08 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	2,77 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>
<i>Dendroligotrichum dendroides</i>	29,84 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>	2,36 $\pm$ 0,28 <sup>cd</sup>	1,08 $\pm$ 0,16 <sup>cd</sup>	0,46 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	1,15 $\pm$ 0,08 <sup>abc</sup>	0,16 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	2,16 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	3,59 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>
Media	<b>12,99<math>\pm</math>3,43<sup>c</sup></b>	<b>0,65<math>\pm</math>0,34<sup>c</sup></b>	<b>0,28<math>\pm</math>0,19<sup>c</sup></b>	<b>0,37<math>\pm</math>0,1<sup>b</sup></b>	<b>1,85<math>\pm</math>0,28<sup>b</sup></b>	<b>0,15<math>\pm</math>0,04<sup>b</sup></b>	<b>1,11<math>\pm</math>0,22<sup>b</sup></b>	<b>3,12<math>\pm</math>0,23<sup>b</sup></b>

<sup>1</sup> El grosor del mesófilo ha sido medido a partir de imágenes realizadas por microscopía óptica, y Sm/S, Sc/S y Sc/Sm, Tcw, Tcyt, Lchl y Tchl han sido determinadas a partir de imágenes realizadas mediante microscopía electrónica. Los valores son medias de 2 o 3 réplicas  $\pm$  SE.

<sup>2</sup> Las letras en superíndice indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre las diferentes especies y grupos basado en la prueba de comparación múltiple de Tukey para cada una de las características.

<sup>3</sup> A.p.c equivale a Antocerota pendiente de clasificar y H.p.c a hepática pendiente de clasificar.

**Tabla 2.** Características fisiológicas medidas en todas las especies. Valores de las medias  $\pm$  SE de  $g_m$  siguiendo la metodología descrita por Tomás *et al* (2013).

Especies	$g_m$ (mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )
<b>Antocerotas</b>	
<i>A.p.c</i>	2,6 $\pm$ 0,12
<i>Megaceros fuegiensis</i>	2,2 $\pm$ 0,08
<b>Media</b>	<b>2,4<math>\pm</math>0,21</b>
<b>Hepáticas</b>	
<i>Lepidozia chordulifera</i>	2,2 $\pm$ 0,21
<i>H.p.c 1</i>	3 $\pm$ 0,22
<i>Symphyogyna hymenophyllum</i>	2,4 $\pm$ 0,36
<i>Radula diversifolia</i>	3,5 $\pm$ 0,55
<i>H.p.c 2</i>	3,4 $\pm$ 0,16
<i>Neckera spp</i>	0,8 $\pm$ 0,06
<b>Media</b>	<b>2,5<math>\pm</math>0,41</b>
<b>Musgos</b>	
<i>Pentastichella pentasticha</i>	2,7 $\pm$ 0,35
<i>Dicranoma imponens</i>	16,5 $\pm$ 0,2,86
<i>Weymouthia mollis</i>	15,8 $\pm$ 0,14
<i>Weymouthia cochlearifolia</i>	15,8 $\pm$ 0,11
<i>Breutelia suplicata</i>	13,1 $\pm$ 0,62
<i>Dendroligotrichum dendroides</i>	140,2 $\pm$ 16,37
<b>Media</b>	<b>34<math>\pm</math>21,33</b>

<sup>1</sup> Las letras en superíndice indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre las diferentes especies y grupos basado en la prueba de comparación múltiple de Tukey para cada una de las características.

<sup>2</sup> A.p.c equivale a Antocerota pendiente de clasificar y H.p.c a hepática pendiente de clasificar.

#### Correlación entre los datos

Realizada la matriz de correlación de Pearson para los 10 parámetros analizados y combinando las 14 especies estudiadas en este trabajo (Tabla 3), y hecha a continuación de forma separada las matrices para los tres grupos vegetales diferenciados, antocerotas, hepáticas y musgos (no mostradas), se describen sólo las correlaciones significativas al análisis conjunto y ratificadas por el análisis separado, es decir, significativas para antocerotas, hepáticas y musgos de forma independiente. De esta manera, en general, se observa cierta correlación entre los caracteres estudiados, exceptuando la  $g_m$  que no se correlaciona significativamente con ningún parámetro anatómico estudiado, aunque se observa que esta se ve afectada principalmente por la Sm/S y Sc/S ( $r^2=0.251$  y  $0.244$  respectivamente). En cuanto a los caracteres anatómicos, se corroboró como algunos de estos correlacionaban entre sí de la manera esperada, como es el caso de la Sm/S y Sc/S (con una correlación de  $r^2=0.949$ ) o Sc/S con Tcw ( $r^2=0.459$ )

**Tabla 3.** Matriz de correlación de Pearson de los parámetros fisiológicos y anatómicos medidos a las 14 especies. Los valores en negrita indican que los coeficientes de correlación fueron significativos ( $P < 0.01$ )

	$g_m$ ( $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )	TM ( $\mu\text{m}$ )	Sm/S ( $\mu\text{m}$ )	Sc/S ( $\mu\text{m}$ )	Sc/Sm ( $\mu\text{m}$ )	Tcyt ( $\mu\text{m}$ )	Tcw ( $\mu\text{m}$ )	Tchl ( $\mu\text{m}$ )	Lchl ( $\mu\text{m}$ )
$g_m$ ( $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )		-0,065	0,251	0,244	0,161	-0,127	-0,068	-0,108	-0,148
TM ( $\mu\text{m}$ )			0,128	0,058	-0,095	<b>0,486</b>	0,187	<b>0,586</b>	<b>0,560</b>
Sm/S ( $\mu\text{m}$ )				<b>0,949</b>	0,282	<b>0,601</b>	<b>0,456</b>	<b>0,585</b>	<b>0,673</b>
Sc/S ( $\mu\text{m}$ )					<b>0,514</b>	<b>0,591</b>	<b>0,459</b>	<b>0,564</b>	<b>0,636</b>
Sc/Sm ( $\mu\text{m}$ )						0,093	0,115	0,082	0,093
Tcyt ( $\mu\text{m}$ )							<b>0,433</b>	<b>0,922</b>	<b>0,861</b>
Tcw ( $\mu\text{m}$ )								<b>0,487</b>	<b>0,537</b>
Tchl ( $\mu\text{m}$ )									<b>0,933</b>
Lchl ( $\mu\text{m}$ )									

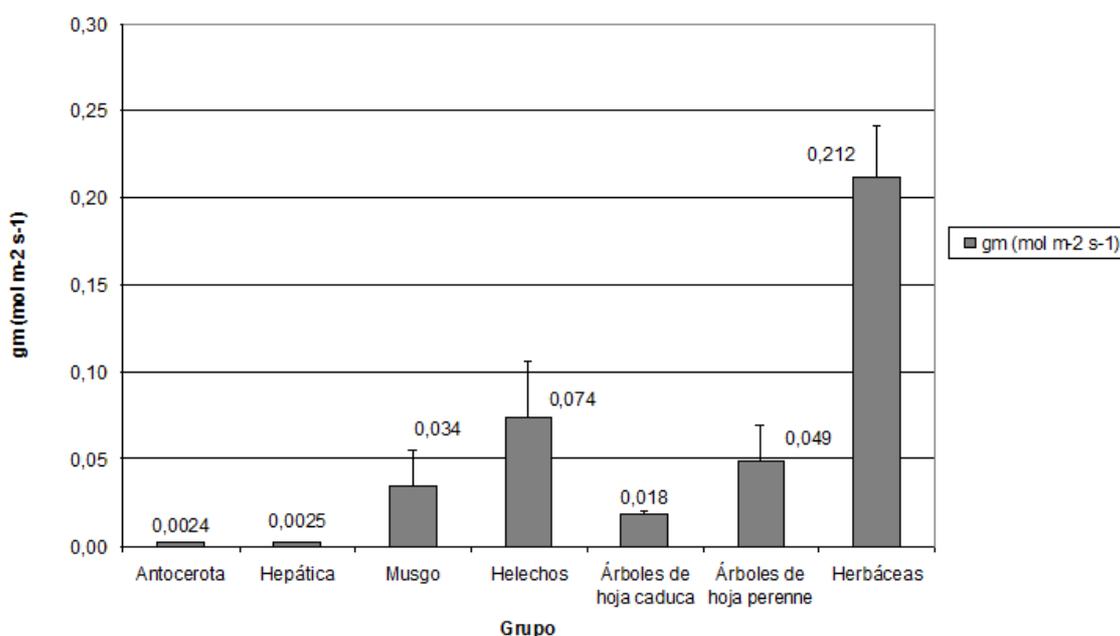
## Tendencia evolutiva en determinados parámetros estudiados

Uno de los objetivos de este trabajo era evidenciar si existe cierto patrón evolutivo en algunos de los parámetros medidos, como es el caso del grosor de la pared celular, el área de la superficie cloroplástica expuesta en el espacio aéreo intercelular y  $g_m$ , y para ello se comparan los valores expuestos en este trabajo con estudios realizados por Tomás (2013) y Carriquí (2014) (Tabla 4). Graficando y comparando estos resultados podemos observar como los grupo de organismos más evolucionados presentan valores de  $g_m$  y Sc/S más elevados (figura 2 y 3A) y valores de Tcw inferiores (figura 3B) respecto a los grupos de organismos más basales, siendo así que las Antocerotas tengan los valores más bajos para Sc/S ( $0,078 \mu\text{m}$ ) y  $g_m$  ( $0,0024 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y más elevados respecto a la Tcw ( $3,29 \mu\text{m}$ ); mientras que los helechos tienen unos valores intermedios entre este grupo y el de las herbáceas, siendo este último el que presenta los valores más elevados en Sc/S y  $g_m$  ( $14 \mu\text{m}$  y  $0,212 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  respectivamente) y valores más pequeños en el grosor de la pared celular ( $0,14 \mu\text{m}$ ).

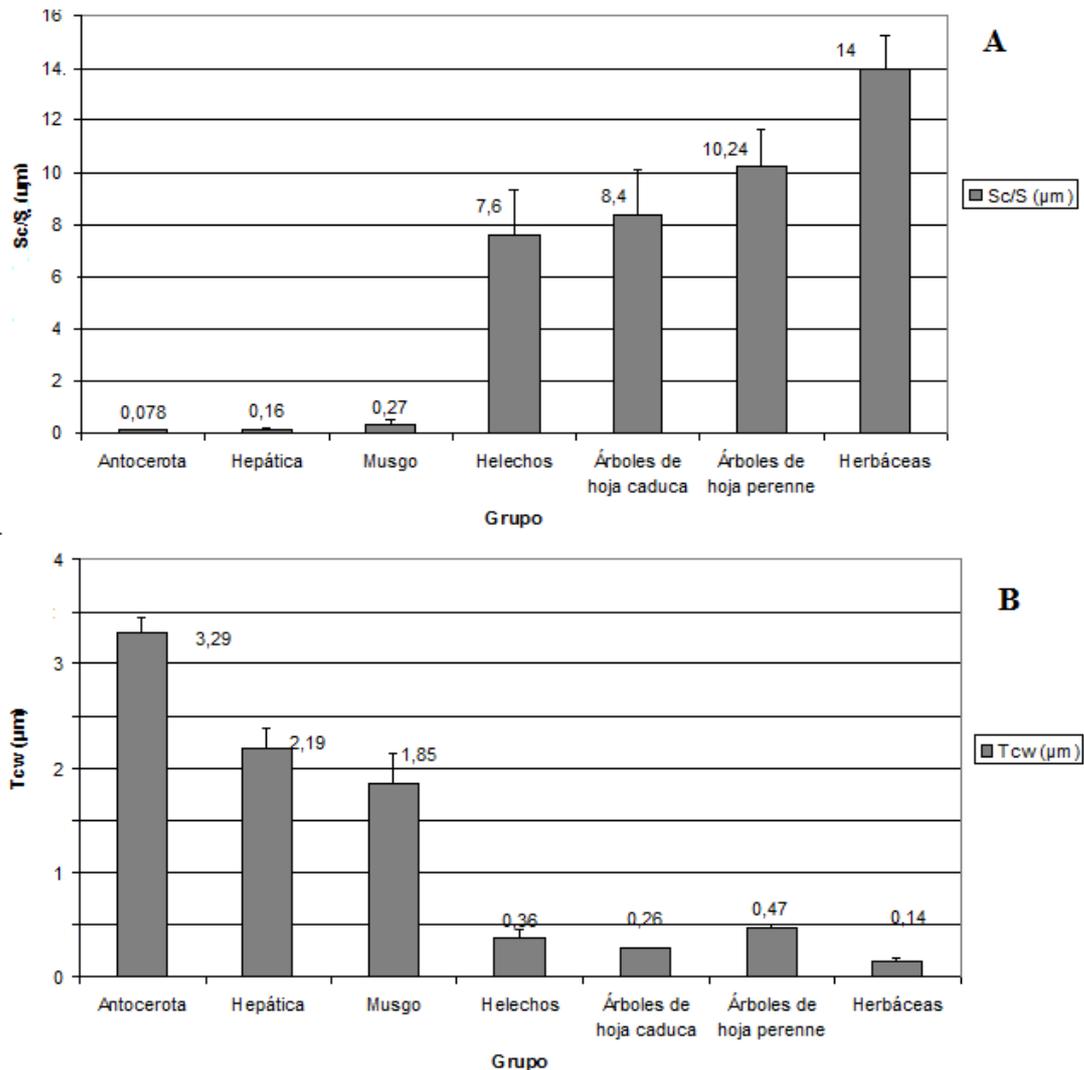
**Tabla 4.** Características anatómicas y fisiológicas en algunos grupos de organismos. Valores de las medias  $\pm$  SE del área de la superficie cloroplástica expuesta en el espacio aéreo intercelular (Sc/S), el grosor de la pared celular (Tcw) y la conductancia del mesófilo ( $g_m$ ).

Grupo	Sc/S ( $\mu\text{m}$ )	Tcw ( $\mu\text{m}$ )	$g_m$ ( $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
Antocerota	$0,078 \pm 0,022$	$3,29 \pm 0,15$	$0,0024 \pm 0,0002$
Hepática	$0,16 \pm 0,035$	$2 \pm 0,19$	$0,0025 \pm 0,0004$
Musgo	$0,27 \pm 0,19$	$1,85 \pm 0,28$	$0,034 \pm 0,021$
Helechos	$7,6 \pm 1,7$	$0,36 \pm 0,08$	$0,074 \pm 0,032$
Árboles de hoja caduca	$8,4 \pm 1,66$	$0,26 \pm 0,01$	$0,018 \pm 0,002$
Árboles de hoja perenne	$10,24 \pm 1,37$	$0,47 \pm 0,02$	$0,049 \pm 0,021$
Herbáceas	$14 \pm 1,21$	$0,14 \pm 0,04$	$0,212 \pm 0,029$

<sup>1</sup>Los valores de helechos se encuentran en el trabajo realizado por Carriquí en el año 2012-2013 y los valores de caducifolios, perennes y herbáceas del trabajo realizado por Tomás y colaboradores (2013).

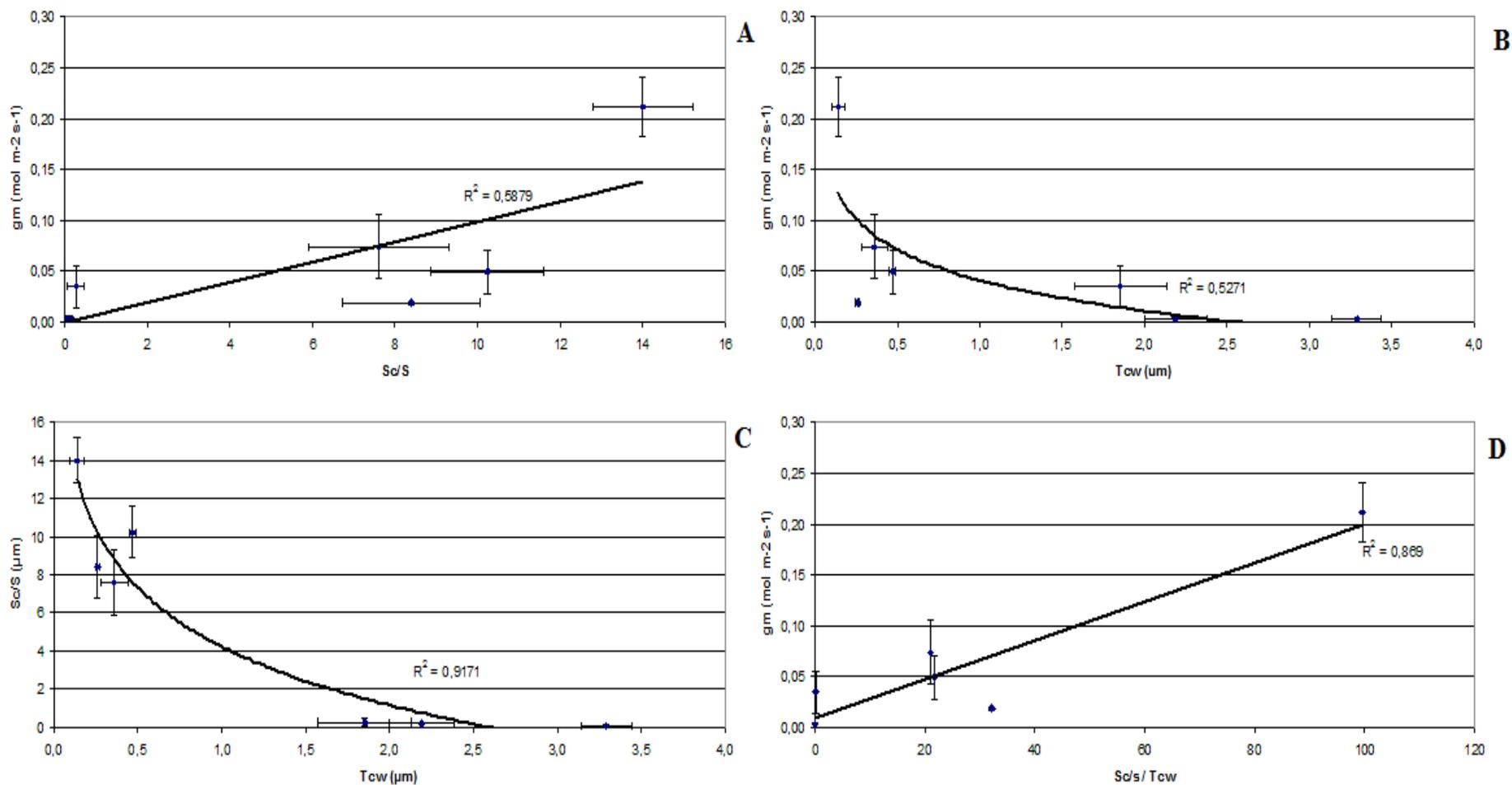


**Figura 2.** Valores de  $g_m$  en diferentes grupos de organismos. Los valores son medias  $\pm$  SE de tres réplicas por especie, de 5 o 6 especies por grupo exceptuando las antocerotas con 2 especies en este grupo.



**Figura 3.** Valores medios de Sc/S y Tcw en diferente grupo de organismos. Los valores son medias  $\pm$  SE de tres réplicas por especie, de 5 o 6 especies por grupo exceptuando las antocerotas con 2 especies en este grupo.

Además graficando las correlaciones más interesantes, se confirma una tendencia lineal entre el parámetro fisiológico ( $g_m$ ) con dos de los parámetros anatómicos recopilados (Sc/S y Tcw) (figura 4A y B) con  $r^2=0,5879$  y  $0,5271$  respectivamente. También se debe destacar la fuerte correlación negativa que existe entre estos dos parámetros anatómicos (figura 4C) con una  $r^2=0,9171$ , es por ello que hacemos el cociente de estos dos parámetros (Sc/S / Tcw) para después correlacionarlo con la  $g_m$ , mostrando así la marcada tendencia lineal entre estos dos parámetros (figura 4D).



**Figura 4.** Correlación de la conductancia del mesófilo ( $g_m$ ) con la superficie cloroplástico expuesta a los espacios aéreos intercelulares por área de hoja ( $Sc/S$ ), y con el grosor de la pared celular ( $Tcw$ ), A y B, respectivamente; la correlación de  $Sc/S$  con  $Tcw$ , C, y para terminar la  $g_m$  con la fracción  $Sc/S / Tcw$ , D. Los valores son medias  $\pm$  SE de tres o dos réplicas por especie, de 5 o 6 especies por grupo exceptuando las antocerotas con 2 especies en este grupo.

## Discusión

Hasta el presente estudio, sólo se habían estimado valores de  $g_m$  en Briófitas mediante métodos de discriminación de isótopos de carbono *online*, y habiéndose documentado muy pocas especies (5 hepáticas, 1 antocerota, y 1 musgo) (Meyer *et al.*, 2008; Hanson *et al.*, 2014), las cuales mostraron un rango de 9,3-42,2  $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , con un valor medio de 24,8  $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Medir  $g_m$  mediante el análisis de la morfología foliar es novedoso, y con el presente estudio, se han obtenido valores de  $g_m$  para 6 especies de musgos, 6 hepáticas y 2 antocerotas, con una media total de 13  $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , en donde los valores más elevados se encuentran en musgos, seguido por las hepáticas y las antocerotas, estos dos últimos con valores muy similares (34,1, 2,56 y 2,42  $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , respectivamente) (Tabla 2). Es interesante destacar que este rango de valores coincide plenamente con el publicado a partir de datos isotópicos, lo que corrobora la validez del método anatómico aquí utilizado. A su vez, estos valores están muy por debajo de los valores promediados por helechos coníferas, caducifolias o herbáceas (0,075 0.1, 0.18, 0.3  $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  respectivamente), y a pesar de no poseer datos de especies más basales como las algas verdes, se remarca que hay una tendencia evolutiva en incrementar la conductancia del mesófilo en el proceso de diversificación de las embriofitas, tal y como se puede observar en la figura 2. Con los datos obtenidos en este trabajo añadidos a los recopilados por Flexas *et al.* (2012) se evidencia más claramente esta tendencia hacia una mayor  $g_m$ . Si se hubiese podido medir la fotosíntesis neta, lo más probable es que ésta presentase valores menores en comparación con especies más evolucionadas, de hecho los valores de fotosíntesis documentados hasta la fecha rondan entre 2.2-7.8  $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Rice *et al.*, 2011), valores inferiores a los habituales en plantas vasculares. Una explicación de estas tasas tan inferiores, podrían ser la baja  $g_m$  que presentan las Briófitas, ya que se ha demostrado que un fuerte limitante de la fotosíntesis es la conductancia del mesófilo (Flexas *et al.* 2012). Es por ello que en estudios futuros sería de gran importancia poder estimar  $g_m$  en este grupo de organismos, al igual que otros parámetros fisiológicos como la evapotranspiración real (*ETR*), conductancia cuticular ( $g_{\text{cut}}$ ) o la velocidad máxima de carboxilación calculada a partir del intercambio de gases mediante  $C_c$  ( $V_{c_{\text{max}}}$ ).

Además comparando los valores obtenidos de  $T_{\text{cw}}$  y  $Sc/S$ , junto con los de otros estudios (Waite and Sack., 2010; Tomás *et al.*, 2013; Carriqui *et al.*, 2014), se muestra una tendencia filogenética a aumentar la superficie cloroplástica expuesta a los espacios aéreos intercelulares por superficie foliar y a disminuir el grosor de la pared celular (Figura 3A y B). Por un lado la  $Sc/S$  comprende valores de entre 0.05-1 en Briófitas, de 4-14 en helechos y de 12-26 en fanerógamas; mientras que la pared celular comprende valores de entre 1 y 3  $\mu\text{m}$  en Briófitas, de entre 0.2 y 0.8  $\mu\text{m}$  en helechos, de entre 0.1 y 0.5  $\mu\text{m}$  en fanerógamas. Estos resultados sugieren que el grosor de la pared celular, que resultó imprescindible para la colonización del medio terrestre por las plantas, ya que les permitía mantener la turgencia de los tejidos y preservar la estructura de las células en condiciones de desecación, ha tenido que sufrir un proceso evolutivo hacia un menor grosor para permitir así alcanzar mayores tasas fotosintéticas, gracias también al aumento de la superficie cloroplástica expuesta a los espacios aéreos intercelulares por superficie foliar, fenómeno que se correlaciona fuertemente con la disminución en el grosor de las paredes celulares (figura 4C).

Finalmente, y así como apuntan Tomás y colaboradores (2013), la  $g_m$  se ve afectada por la superficie cloroplástica expuesta a los espacios aéreos intercelulares por superficie foliar ( $Sc/S$ ) y por el grosor de la pared celular ( $T_{\text{cw}}$ ), para confirmar lo expuesto en este estudio y averiguar si ocurre en toda la historia evolutiva de las plantas, se correlacionaron estos parámetros, en todos los grupos de organismos recopilados en el presente estudio, y al observar las figuras 4A y B se evidencia una tendencia evolutiva clara que organismos con  $Sc/S$  mayores y con  $T_{\text{cw}}$  menores son los que tienen una conductancia del mesófilo más elevada, ya que paredes menos gruesas y una mayor exposición de cloroplastos hace que el  $\text{CO}_2$  tenga menos dificultad de difundir desde el exterior de la célula hasta el centro de carboxilación de los cloroplastos. Y sabiendo además la alta correlación que existe entre estos dos parámetros anatómicos (figura 4C), se correlacionó el cociente de estos dos con la  $g_m$  (figura 4D) demostrando fuertemente ( $r^2=0,869$ ) que la varianza evolutiva en  $g_m$  en estos grupos de organismos es debida ha estos dos parámetros anatómicos.

## **Conclusiones**

Con el presente estudio se han podido ampliar los conocimientos sobre la conductancia del mesófilo en este grupo de organismos, siendo la primera vez que se hace mediante el análisis de algunos de sus parámetros anatómicos. Además se añaden conocimientos, previamente inexistentes, sobre algunos de estos parámetros, como es el caso de la Sc/S. También se confirma la tendencia evolutiva hacia un aumento de la conductancia del mesófilo, a una disminución en el grosor de la pared celular y hacia un aumento en la superficie cloroplástica expuesta a los espacios aéreos intercelulares por superficie foliar. Finalmente se remarca la necesidad de profundizar más en el conocimiento de la fisiología en este grupo de organismos, como por ejemplo, ampliar más los estudios sobre fotosíntesis y sus posibles limitaciones.

## Bibliografía

- Bisbee, K. E., Gower, S. T., Norman, J. M., & Nordheim, E. V. (2001). Environmental controls on ground cover species composition and productivity in a boreal black spruce forest. *Oecologia*, *129*(2), 261-270.
- Campbell, C., Vitt, D. H., Halsey, L. A., Campbell, I. D., Thormann, M. N., & Bayley, S. E. (2000). Net primary production and standing biomass in northern continental wetlands. *Information Report-Northern Forestry Centre, Canadian Forest Service*, (NOR-X-369).
- Clymo, R. S., & Hayward, P. M. (1982). The ecology of Sphagnum. In *Bryophyte ecology* (pp. 229-289). Springer Netherlands.
- Evans, J. R., Kaldenhoff, R., Genty, B., & Terashima, I. (2009). Resistances along the CO<sub>2</sub> diffusion pathway inside leaves. *Journal of Experimental Botany*, *60*(8), 2235-2248.
- Evans, J. R., Caemmerer, S. V., Setchell, B. A., & Hudson, G. S. (1994). The relationship between CO<sub>2</sub> transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of Rubisco. *Functional Plant Biology*, *21*(4), 475-495.
- Feild, T. S., Brodribb, T. J., Iglesias, A., Chatelet, D. S., Baresch, A., Upchurch, G. R., ... & Jaramillo, C. (2011a). Fossil evidence for Cretaceous escalation in angiosperm leaf vein evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(20), 8363-8366.
- Flexas, J., Barbour, M., Brendel, O., Cabrera, H.M., Carriquí, M., Díaz-Espejo, A., Douthe, C., Dreyer, E., Ferrio, J.P., Gago, J., Galle, A., Galmés, J., Kodama, N., Medrano, H., Niinemets, U., Peguero-Pina, J.J., Pou, A., Ribas-Carbó, M., Tomás, M., Warren, R.C. (2012). Mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub>: an unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Sci*, 193–194, 70–84.
- Flexas J, Ribas-Carbó M, Diaz-Espejo A, Galmés J, Medrano H. (2008). Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>: current knowledge and future prospects. *Plant, Cell & Environment* *31*, 602–621.
- Gago, J., Coopman, R. E., Cabrera, H. M., Hermida, C., Molins, A., Conesa, M. À., ... & Flexas, J. (2013). Photosynthesis limitations in three fern species. *Physiologia plantarum*, *149*(4), 599-611.
- Goulden, M. L., & Crill, P. M. (1997). Automated measurements of CO<sub>2</sub> exchange at the moss surface of a black spruce forest. *Tree physiology*, *17*(8-9), 537-542.
- Griffiths, H., Maxwell, K., Richardson, D., & Robe, W. (2004). Turning the land green: inferring photosynthetic physiology and diffusive limitations in early bryophytes. *The Evolution of Plant Physiology*, (21), 1.
- Gunnarsson, U. (2005). Global patterns of Sphagnum productivity. *Journal of Bryology*, *27*(3), 269-279.
- Hanson, D. T., & Rice, S. K. (2014). Photosynthesis in bryophytes and early land plants. Dordrecht: Springer.
- Lewis, L. A., & McCourt, R. M. (2004). Green algae and the origin of land plants. *American journal of Botany*, *91*(10), 1535-1556.

- Meyer, M., Seibt, U., & Griffiths, H. (2008). To concentrate or ventilate? Carbon acquisition, isotope discrimination and physiological ecology of early land plant life forms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1504), 2767-2778.
- Niinemets, Ü. (1999). Research review. Components of leaf dry mass per area–thickness and density–alter leaf photosynthetic capacity in reverse directions in woody plants. *New Phytologist*, 144(1), 35-47.
- Niinemets, Ü., Díaz-Espejo, A., Flexas, J., Galmés, J., & Warren, C. R. (2009). Role of mesophyll diffusion conductance in constraining potential photosynthetic productivity in the field. *Journal of Experimental Botany*, 60(8), 2249-2270.
- Niinemets, Ü., Portsmouth, A., Tena, D., Tobias, M., Matesanz, S., & Valladares, F. (2007). Do we underestimate the importance of leaf size in plant economics? Disproportional scaling of support costs within the spectrum of leaf physiognomy. *Annals of Botany*, 100(2), 283-303.
- Proctor, M. C. (2000). The bryophyte paradox: tolerance of desiccation, evasion of drought. *Plant Ecology*, 151(1), 41-49.
- Raven, J. A., Cockell, C. S., & De La Rocha, C. L. (2008). The evolution of inorganic carbon concentrating mechanisms in photosynthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1504), 2641-2650.
- Renzaglia, K. S., Schuette, S., Duff, R. J., Ligrone, R., Shaw, A. J., Mishler, B. D., & Duckett, J. G. (2007). Bryophyte phylogeny: advancing the molecular and morphological frontiers. *The Bryologist*, 110(2), 179-213.
- Rice, S. K., & Giles, L. (1996). The influence of water content and leaf anatomy on carbon isotope discrimination and photosynthesis in Sphagnum. *Plant, Cell & Environment*, 19(1), 118-124.
- Rice, S. K., Neal, N., Mango, J., & Black, K. (2011). Relationships among shoot tissue, canopy and photosynthetic characteristics in the feathermoss *Pleurozium schreberi*. *The Bryologist*, 114(2), 367-378.
- Scafaro, A. P., Von Caemmerer, S., Evans, J. R., & Atwell, B. J. (2011). Temperature response of mesophyll conductance in cultivated and wild *Oryza* species with contrasting mesophyll cell wall thickness. *Plant, Cell & Environment*, 34(11), 1999-2008.
- Silvola, J. (1990). Combined effects of varying water content and CO<sub>2</sub> concentration on photosynthesis in *Spagnum fuscum*. *Ecography*, 13(3), 224-228.
- Sveinbjörnsson, B., & Oechel, W. C. (1992). Controls on growth and productivity of bryophytes: environmental limitations under current and anticipated conditions. *Bryophytes and lichens in a changing environment*, 77, 102.
- Terashima I, Hanba YT, Tazoe Y, Vyas P, Yano S. (2006). Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO<sub>2</sub> diffusion. *Journal Experimental Botany* 57, 343–354.
- Terashima I, Hanba YT, Tholen D, Niinemets Ü. (2011). Leaf functional anatomy in relation to photosynthesis. *Plant Physiology* 155, 108–116.
- Thain, J.F. (1983) Curvature correlation factors in the measurements of cell surface areas in plant tissues. *Journal of Experimental Botany*, 34: 87–94.

Tholen D, Boom C, Noguchi K, Ueda S, Katase T, Terashima I. (2008). The chloroplast avoidance response decreases internal conductance to CO<sub>2</sub> diffusion in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant, Cell and Environment* 31, 1688–1700.

Tomás, M., Flexas, J., Copolovici, L., Galmés, J., Hallik, L., Medrano, H., & Niinemets, Ü. (2013). Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub> across species: quantitative limitations and scaling up by models. *Journal of experimental botany*, 64(8), 2269-2281.

Tosens T, Niinemets Ü, Vislap V, Eichelmann H, Castro-Díez P. (2012). Developmental changes in mesophyll diffusion conductance and photosynthetic capacity under different light and water availabilities in *Populus tremula*: how structure constrains function. *Plant, Cell & Environment* 35, 839–856.

Tosens T, Niinemets Ü, Westoby M, Wright IJ. 2012b. Anatomical basis of variation in mesophyll resistance in eastern Australian sclerophylls: news of a long and winding path. *Journal of Experimental Botany* 63, 5105–5119.

Turmel, M., Pombert, J. F., Charlebois, P., Otis, C., & Lemieux, C. (2007). The green algal ancestry of land plants as revealed by the chloroplast genome. *International Journal of Plant Sciences*, 168(5), 679-689.

Volkova, L., Bennett, L.T., Tausz, M. (2009) Effects of sudden exposure to high light levels on two tree fern species *Dicksonia antarctica* (Dicksoniaceae) and *Cyathea australis* (Cyatheaceae) acclimated to different light intensities. *Aust J Bot*, 57: 562–571.

Waite, M., & Sack, L. (2010). How does moss photosynthesis relate to leaf and canopy structure? Trait relationships for 10 Hawaiian species of contrasting light habitats. *New Phytologist*, 185(1), 156-172.

Williams TG, Flanagan LB. (1996). Effects of changes in water content on photosynthesis, transpiration and discrimination against <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> and C<sup>18</sup>O<sup>16</sup>O in *Pleurozium* and *Sphagnum*. *Oecologia* 108: 38–46.

Wright, I. J., Reich, P. B., Westoby, M., Ackerly, D. D., Baruch, Z., Bongers, F., ... & Villar, R. (2004). The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, 428(6985), 821-827.