Universitat de les Illes Balears

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Comparación de características anatómicas y fotosintéticas de especies de helechos sensibles y tolerantes a la desecación.

Sonia Ramis Pozuelo

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: desecación, sensible, tolerante, pteridófitos, anatomía, fotosíntesis.

Índice

RESUMEN: **4**

ABSTRACT: **4**

INTRODUCCIÓN: **5**

MATERIAL Y MÉTODOS: **7**

DISEÑO EXPERIMENTAL: MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO. 7

MEDIDAS MORFOMÉTRICAS DE LA ANATOMÍA FOLIAR: 9

MEDIDAS DE LOS PARÁMETROS FUNCIONALES: 10

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: 11

RESULTADOS: **11**

CARACTERIZACIÓN DE LA ANATOMÍA FOLIAR DE HELECHOS CON DIFERENTE TOLERANCIA A LA DESECACIÓN: 13

COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD FOTOSINTÉTICA DE HELECHOS CON DIFERENTE TOLERANCIA A LA DESECACIÓN: ... 15

DISCUSIÓN: **17**

CONCLUSIÓN: **19**

AGRADECIMIENTOS: **19**

REFERENCIAS: **20**

Resumen:

Las plantas tolerantes a la desecación son capaces de equilibrar su contenido de agua con la del aire seco y recuperarse. Esta estrategia la siguen líquenes, briofitos, algunas angiospermas y pteridofitos. Mientras numerosos estudios se han centrado en describir los mecanismos moleculares que rigen el éxito evolutivo de las plantas tolerantes a la desecación, pocos se han centrado en comparar la anatomía y la fisiología de plantas sensibles a la sequía (DS) y plantas tolerantes (DT). El objetivo principal de este estudio fue comparar la fisiología de pteridofitos sensibles y pteridofitos tolerantes a la desecación. Los resultados muestran que los helechos tolerantes a la desecación analizados tienen un mayor grosor de la hoja y tasas de fotosíntesis más elevadas. Además, sugieren que los helechos DT presentan características anatómicas típicas de plantas más expuestas a la luz. Se propone que tales diferencias entre helechos DT y DS permiten a las tolerantes vivir en ambientes donde el agua es un recurso limitado.

Abstract:

Deseccation tolerant plants are able to equilibrate their water content with that of dry air and recover. This strategy is present in lichens, bryophytes, some angiosperms and pteridophytes. While numerous studies have focused on describing the molecular mechanisms of resurrection plants. Few have focused on comparing the anatomy and physiology of non drought tolerance (DS) and drought tolerant (DT) plants. The main objective of this study was to compare the physiology of pteridophytes sensitive and pteridophytes tolerant to desiccation. The results show that resurrection ferns have a higher leaf thickness and higher photosynthesis rates. In addition, it is suggested that DT ferns have typical anatomical characteristics of plants exposed to light. It is proposed that such differences between DT and DS ferns allow the dessecation tolerants to live in environments where water is a limited resource.

Introducción:

El agua dulce es un recurso escaso en numerosas partes del mundo (Ortiz-Ospina *et al.,* 2016), en la actualidad la gestión de los recursos naturales es de vital importancia para el desarrollo, por lo que, para la producción agrícola y el cultivo de cultivares, entender los mecanismos de eficiencia del agua se presenta como un desafío para permitir altos rendimientos de biomasa (Sørensen *et al.,* 2018). La fotosíntesis es uno de los procesos clave para el crecimiento y la productividad de las plantas. En consecuencia, entender los mecanismos de las plantas para la respuesta a las situaciones de sequía es clave para poder mejorar el rendimiento de estas con estrés abiótico y mejorar el uso del agua (Fortunati *et al.,* 2008).
La evolución ha modulado las plantas vasculares desde su colonización terrestre, que probablemente ocurrió de manera gradual a partir del Ordovícico Medio (Steemans *et al.,* 2009). Las plantas vasculares se enfrentaron a limitaciones diferentes a las de sus precursores evolutivos en el agua (Proctor *et al.,* 2002). Entre estas limitaciones, la disponibilidad de nutrientes y el uso del agua superficial. Dejando un amplio abanico de estructuras diferentes. La hoja es uno de los órganos más importantes de la planta y es fundamental para el funcionamiento de los ecosistemas terrestres (Wright *et al.,* 2004), siendo los principales órganos donde se lleva a cabo la fotosíntesis. La capacidad fotosintética varía considerablemente entre las diferentes especies (Hikosaka *et al.,* 2009). No solo es importante su capacidad fotosintética sino la resistencia para soportar el estrés biótico y abiótico que puedan experimentar los diferentes órganos de la planta. Por ejemplo, las hojas están expuestas a diversos estreses como la desecación, el drenaje de la lluvia, el calor, las heladas, la irradiancia, el viento, los insectos patógenos y microorganismos entre otros (Onoda *et al.,* 2012). Para combatir el estrés hídrico existen tres mecanismos: escape, evitación y tolerancia (Franks *et al.,* 2011). El primero se trata de la finalización temprana del ciclo. El segundo mecanismo, presente en la mayoría de las plantas vasculares, consiste en el retraso de la desecación mediante las barreras estructurales como por ejemplo el cierre de los estomas (Chaves *et al.,* 2009). El tercero, la tolerancia a la desecación, es la capacidad que poseen algunos organismos para tener el contenido de agua equilibrado con el del aire seco y recuperarse cuando aumentan los suministros de agua (Fernández-Marín et al., 2016). Se puede entender como el mecanismo en el que se basaron las primeras plantas vasculares para sobrevivir (Watkins *et al.,* 2007). Este último hace referencia a los grupos de: líquenes, briofitos, algunas angiospermas y pteridofitos (Franks *et al.,* 2011).

Los pteridofitos, son un grupo ancestral de plantas con un gran número de representantes, por lo que proporcionan una información valiosa sobre los procesos evolutivos que ayudan a comprender los mecanismos actuales (Pausas & Sáez *et al.,* 2000). Se han observado distintas especies de pteridofitos con diferentes características fotosintéticas y rangos de tolerancia a la desecación (Brodribb & Holbrook, 2003). La mayoría de especies que siguen esta estrategia de tolerar la desecación son especies que habitan en afloramientos de rocas tropicales, afloramientos gnéisicos y granitos aislados (Alcantara *et al.,* 2015). Hasta el momento se han descrito alrededor de 250 especies (Fernandez-Marin & Holzinger*,* 2016). En condiciones limitantes las especies de resurrección responden secando las partes vegetativas, hasta mostrar una apariencia de muertas. Se conduce a un cierre estomático y cese de la actividad fotosintética. Cuando se rehidratan su metabolismo reanuda la normalidad (Proctor & Tuba*,* 2002). Las consecuencias fisiológicas que suceden durante la

desecación son cambios en la abundancia de las proteínas (Oliver *et al.,* 2011), acumulación de osmoprotectores de bajo peso molecular relacionado con la conservación de la turgencia (Farrant *et al.,* 2000), la división de la vacuola central que ofrece estabilidad (Rascio & LaRocca, 2005; Proctor *et al.,* 2007) y las paredes de la célula se vuelven más flexibles (Moore *et al.,* 2009). Estas plantas pueden permanecer en dichas condiciones durante largos periodos de tiempo, durante los cuales se impide el crecimiento, la reproducción y las hojas pueden perder hasta un 95% de su contenido en agua. Al rehidratarse, en 24 horas, pueden llegar a recuperar la funcionalidad de los tejidos (Bernacchia *et al.,* 1996). Esta capacidad frente a condiciones adversas les proporciona una ventaja competitiva, lo que les permite colonizar nichos ecológicos (Scott *et al.,* 2000). Las plantas de resurrección se pueden dividir en dos tipos (Tuba *et al.,* 1998): homioclorofílicas que conservan la clorofila durante la desecación y doblan sus hojas acumulando antocianinas para proteger la clorofila. Por otro lado, en poikiloclorífícas, el aparato fotosintético se atrofia durante la desecación. Los cloroplastos pierden la clorofila que vuelven a sintetizar durante la rehidratación (Farrant *et al.,* 2000; Oliver *et al.,* 2000).
Los tejidos de la planta se mantienen vivos con un metabolismo muy reducido y las tasas de respiración disminuyen significativamente (Tuba *et al.,* 1997). En estudios anteriores de Fernandez-Marin & Holzinger (2016), se sugiere que la fotosítensis influye negativamente cuando no hay suficiente agua para mantener la integridad y las funciones celulares, para la cadena de transporte de electrones y la limitación del CO_2 que se ha generado. Se ha observado que los helechos presentan tasas fotosintéticas más bajas (Tosens *et al.,* 2016), debido a paredes celulares gruesas y la baja conductancia hidráulica (Brodridd *et al.,* 2007).

Investigar las plantas de resurrección es de especial interés debido a que el conocimiento de la estructura y de los mecanismos que les permiten aumentar la tolerancia a la desecación, podrían ser extrapolados a la mejora de los cultivos en las partes más áridas del mundo y a la mejora de la comprensión del crecimiento y regulación de estas plantas (Helseth *et al.,* 2014). Hasta la fecha, se ha realizado un estudio sobre la anatomía y fotosíntesis de plantas de resurrección concretamente en gimnospermas (Alcantara *et al.,* 2015). Debido al desconocimiento de los parámetros anatómicos y fotosintéticos en helechos de resurrección, el presente trabajo tiene como objetivo principal comparar la fisiología entre helechos sensibles a la desecación (DS) y helechos tolerantes a la desecación (DT) a nivel de estructura foliar y fotosíntesis. Entre los objetivos específicos del presente trabajo se encuentran: i) Establecer la relación entre la anatomía foliar y la capacidad de tolerancia a la desecación de las especies de pteridofitos estudiadas. ii) Relacionar la anatomía foliar y la capacidad fotosintética de especies de helechos tolerantes y helechos sensibles a la desecación.

Material y métodos:

Diseño experimental: material vegetal y condiciones de cultivo.

Se realizó el estudio con 10 especies de helechos (pteridofitos). Las especies utilizadas fueron escogidas por abarcar una diferente sensibilidad y tolerancia a la desecación. El total de especies vegetales utilizadas, así como su taxonomía y hábitat en el presente trabajo están referenciados en la Tabla 1.
Las cuatro especies con un rango alto de tolerancia a la desecación que se utilizaron fueron: *Asplenium ceterach* L., *Astrolepis sinuata* (Lag. ex Sw.) D.M. Benham & Windham., *Bommeria hispida* (Mett. ex Kuhn), *Cheilanthes eatonii* Baker. Las seis especies elegidas para analizar la sensibilidad a la desecación fueron: *Angiopteris lygodiifolia* Rosenst., *Davallia canariensis* (L) Sm., *Marsilea quadrifolia L.*, *Osmunda regalis* L., *Phlebodium aureum* L. y *Polypodium cambricum* L.. La clasificación de cada especie como tolerante o sensible se realizó siguiendo el método descrito en López-Pozo *et al* (2019). Para comparar los posibles caracteres fisiológicos que influyen en la tolerancia a la desecación de especies sensibles y especies tolerantes, así como relacionar la capacidad fotosintética con su anatomía, se utilizó en el análisis de 3-6 muestras foliares de los individuos de las diferentes especies.

Tabla 1. Listado de especies en función de su tolerancia a la desecación. La clasificación taxonómica se basa en Smith *et al* (2012) y los hábitats fueron caracterizados por: Flora of North América (2019); Zimbabwe flora (2019) y Flora Ibérica (2019).

Especies	Tolerancia a la desecación	Clase	Orden	Familia	Genero	Hábitat
***Angiopteris lygodiifolia* Rosenst.**	Sensible	Marattiopsida	Marattiales	Marattiaceae	*Angiopteris*	Barrancos y arroyos.
***Asplenium ceterach* L.**	Tolerante	Polypodiopsida	Polypoidales	aspleniaceae	*Asplenium*	Grietas y muros de lugares umbrosos.
***Astrolepis sinuata* (Lag. ex Sw.) D.M. Benham & Windham**	Tolerante	Polypodiopsida	Polypoidales	*Pteridaceae*	*Astrolepsis*	Pendientes y salientes rocosos.
Bommeria hispida (Mett. ex Kuhn)	Tolerante	Polypodiopsida	Polypoidales	*Pteridaceae*	*Bommeria*	Laderas secas,húmedas, principalmente en regiones montañosas y xéricas.
Cheilanthes eatonii Baker.	Tolerante	Polypodiopsida	Polypoidales	*Pteridaceae*	*Cheilanthes*	Pendientes y salientes rocosos.
Davallia canariensis (L.) Sm.	Sensible	Polypodiopsida	Polypoidales	Dryopteridaceae	*Davallia*	Zona costera, fisuras de rocas o sobre árboles
***Marsilea quadrifolia* L.**	Sensible	Polypodiopsida	Salviniales	Marsileaceae	*Marsilea*	Crece en aguas tranquilas como estanques, campos de arroz y zanjas.
***Osmunda regalis* L.**	Sensible	Polypodiopsida	Osmundales	Osmundaceae	*Osmunda*	Turberas, en orillas, zanjas, rocas húmedas, en cuevas húmedas y en bosques húmedos.
***Phlebodium aureum* L.**	Sensible	Polypodiopsida	Polypoidales	polypodiaceae	*Phlebodium*	Epífitas, litófitas, terrestres en bosques húmedos y márgenes.
***Polypodium cambricum* L.**	Sensible	Polypodiopsida	*Cyatheales*	polypodiaceae	*Polypodium*	Repisas, grietas y muros.

Las plantas se cultivaron en dos localizaciones diferentes. Por un lado, las especies de pteridofitos: *D. canariensis*, *M. quadrifolia*, *O. regalis*, *P. aureum*, *A. lygodiifolia* y *P. cambricum* (Fig. 1), se ubicaron al aire libre, en el campo experimental de la Universidad de las Islas Baleares (UIB, Mallorca, España). Se colocaron en macetas (5-10L) con sustrato hortícola y perlita (3:1), se regó semanalmente con solución de Hoagland 50% (Nadal *et al.,* 2018). En cambio, las especies de pteridofitos: *A. ceterach*, *A. sinuata*, *B. hispida*, *Ch. Eatonii* (Fig. 2), se cultivaron en el "Royal Botanic Gardens Edinburgh" (Edinburgo, Escocia, Reino Unido). En un invernadero que mantenía las condiciones que simulaban su hábitat árido; el sustrato se trataba de una fracción gruesa de perlita.

Figura 1. Especies muestreadas sensibles a la desecación: (a) *Davallia canariensis*; (b) *Marsilea quadrifolia*; (c) *Angiopteris lygodifolia*; (d) *Phlebodium aureum;* (e) *Polypodium cambricum* y (f) *Osmunda regalis.*

Figura 2. Especies muestreadas tolerantes a la desecación: (a) *Asplenium ceterach*; (b) *Astrolepis sinuata*; (c) *Bommeria hispida* y (d) *Cheilanthes eatonii*.

Las muestras de material vegetal se procesaron en el Servicio de microscopia de la Universidad de Murcia (Murcia, España). Se fijaron como se describe en Carriquí *et al* (2015). Mediante glutaraldehído al 4% y paraformaldehído al 2% en un tampón de fosfato de 0,1M (pH 7,4). Posteriormente, se fijaron en tetróxido de osmio al 2% durante 2 h, y se deshidrataron en una batería de etanol. Las muestras se incluyeron en resina LR-White y se solidificaron en un horno a 60°C durante 48 h. Se realizaron cortes transversalmente con un ultramicrotomo (Leica UC6) a 0,8 µm. Fueron teñidas con azul de toluidina al 1%. A partir de las muestras procesadas se observaron en microscopio óptico Olympus BX60. Se tomaron de tres a seis fotografías, con una cámara digital (U-TVO.5XC; Olympus) a 200 aumentos.

Medidas morfométricas de la anatomía foliar:

Para realizar el análisis morfométrico de la anatomía foliar, las fotos fueron analizadas con el programa de procesamiento de imágenes digitales "Image J", desarrollado por Wayne Rasband en el National Institutes of Health (NIH, Bethesda, MD, USA). Todos los parámetros fueron medidos en longitud (µm) o área (μm^2).
En cada fotografía se han realizado 10 repeticiones de medidas longitudinales en diferentes zonas de la hoja para establecer una correlación significativa de los valores medidos obtenidos para cada uno de los parámetros. Estas medidas se tomaron de las 3-6 fotografías disponibles (dependiendo de las muestras recogidas) de las 10 especies nombradas anteriormente.
Para las medidas morfométricas los valores se han analizado realizando un promedio por hoja. Los parámetros de la hoja de las 10 diferentes especies se representan en la Figura 3. Grueso de la hoja (GH): que se define como el espacio comprendido entre las dos epidermis (la externa y la interna); epidermis superior (ES): estructura superior más externa de la hoja que rodea el mesofilo; epidermis inferior (EI): estructura inferior externa que rodea el mesófilo; mesófilo en empalizada (EP): parte del mesófilo de la hoja, compuesto por tejido

parenquimático, que se caracteriza estructuralmente células ricas en cloroplastos alargadas situadas de forma perpendicular; mesófilo esponjoso (ME): parte del mesófilo de la hoja con tejido parenquimático de forma laxa, la mayoría de las células son isodiamétricas; área de las celulas del mesófilo esponjoso (ACE): se realizaron mediciones del contorno de 10 células representativas del mesófilo esponjoso y se obtuvo un área (μm^2). Con respecto al área de las células del mesófilo en empalizada (AMP): se realizaron mediciones del contorno de las células del mesófilo en empalizada de 10 células diferentes para obtener un área representativa de cada especie. El área del espacio ocupado por células: se trata de la fracción total de la muestra. Fracción del mesófilo ocupado por aire intercelular (EIA): se realizó el sumatorio del área de todos los espacios con aire intercelular encontrados en cada muestra. El porcentaje de aire intercelular interno se realizó mediante las medidas del total del área de la hoja y del contenido de aire intercelular. Por último, se midió el grosor del conjunto formado por la cutícula y la pared celular externa de las dos epidermis (inferior y superior). Solamente en la especie *P. aureum* no se pudo distinguir el mesófilo en empalizada, considerándose todo como esponjoso.

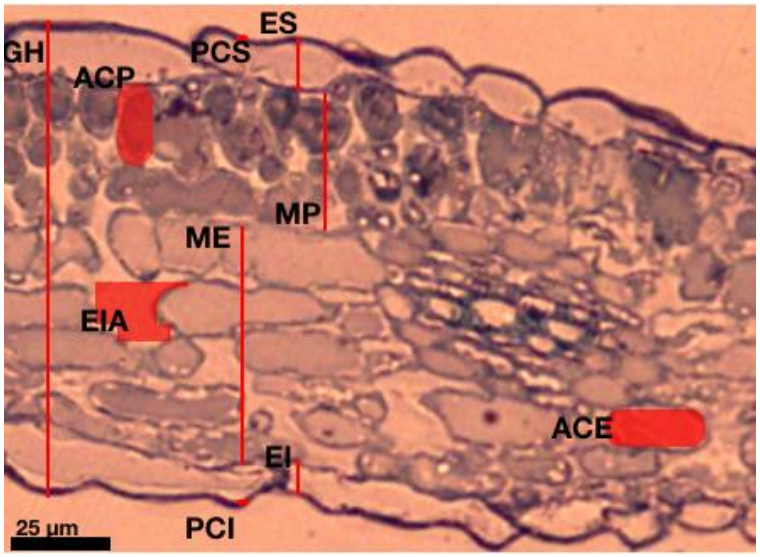

Figura 3. Esquema representativo de los parámetros analizados. La imagen de microscopia óptica (x200) corresponde a una sección de la hoja (*Marsilea quadrifolia L.*). Abreviaciones: grueso de la hoja (GH), epidermis superior (ES), epidermis inferior (EI), mesófilo palizado (MP), mesófilo esponjoso (ME), área de las celulas del mesófilo palizado (ACP), área de las celulas del mesófilo esponjoso (ACE), pared celular y cuticula superior (PCS), pared celular inferior (PCI) y fracción del mesófilo ocupado por aire intercelular (EIA).

Medidas de los parámetros funcionales:

Para analizar la asimilación neta (A_N, µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}) y la conductancia estomática (g_s, mol CO_2 m^{-2} s^{-1}), se utilizó un sistema de intercambio de gases IRGA (de las siglas en inglés *Infrared Gas Analyzer*) abierto con cámara de fluorescencia incorporada (Li-6400; Li-Cor Inc., Lincoln, USA). Se registraron medidas de asimilación neta (A_N), conductancia estomática al CO_2 (g_s) y tasa de transporte de electrones (J_{flu}, µmol e^- m^{-2} s^{-1}) a luz saturante (1500 µmol fotones m^{-2} s^{-1}) después de 20-30 minutos a una concentración de CO_2 de 400 µmol mol^{-1} aire y un flujo de 300 µmol aire s^{-1}. La temperatura de bloque se mantuvo a 25 °C y la

humedad entre 40-60% para evitar un exceso de déficit de presión de vapor durante la medida (Perez-harguindenguy *et al.,* 2016). Por ultimo para las medidas de LMA (masa foliar por área, g m^{-2}), se estimó el área total de una hoja. La medida se realizó con el programa "Image J". Posteriormente, se introdujo la hoja en una estufa a 70°C, durante 2-3 días. Por último, se realizó la relación entre el área y el peso seco de la hoja (g m^{-2}).

Análisis estadístico:

El presente estudio contempla como variables dependientes o respuesta los parámetros anatómicos siguientes: el grosor de la hoja, la epidermis superior, la epidermis inferior, el mesófilo en empalizada, el mesófilo esponjoso, el área de las células del mesófilo esponjoso, el área de las células del mesófilo en empalizada, el aire del espacio intercelular, el conjunto de la cuticula y la epidermis superior y el conjunto de la cutícula y la epidermis inferior. Las variables dependientes de los parámetros fotosintéticos analizados fueron: LMA, A_N, g_s, J_{flu}. Como variable independiente o predictiva utilizada con el fin de observar efectos sobre las variables respuesta, fue la tolerancia a la desecación (variable categórica), con dos niveles: sensible a la desecación y tolerantes a la desecación. La unidad experimental fueron las diferentes especies de helecho. De cada especie se utilizaron de 3 a 6 hojas para las medidas anatómicas y funcionales (*n=3-6*). Con el fin de evitar errores en el análisis estadístico debidos a la pseudoreplicación se realizó una media de los 10 valores anatómicos tomados por hoja.

Todos los análisis de datos fueron realizados mediante el software estadístico libre R (R Development Core Team, 2016). Se utilizaron plots residuales con el fin de determinar la asunción paramétrica de la normalidad y la homocedasticidad de los datos. Muchos de los parámetros anatómicos presentaban una alta correlación por lo que no han sido incluidos todos en el contraste (Tabla 3). Para determinar el efecto de la tolerancia a la desecación en los diferentes parámetros se realizaron ANOVAs de una cola. Aquellos parámetros que mostraron diferencias significativas se realizaron pruebas post hoc de Tukey, tomando como referencia comparativa las especies y no la tolerancia a la desecación. De esta forma se determinaron las diferencias significativas que había entre las especies.

Resultados:

En la Tabla 2, se destaca las diferencias significativas encontradas, entre los diferentes valores anatómicos. Los parámetros que presentaron más similaridad se tratan de el conjunto de epidermis y cutícula inferior y el conjunto de epidermis y cutícula superior. La especie que tuvo mayor GH medio fue *A. ceterach* y coincidió con los valores más altos de epidermis superior, celulas del mesófilo esponjoso y el mesófilo esponjoso. La especie que resultó tener los valores más bajos ha sido *M. quadrifolia* con valores mínimos en el grosor de la hoja y a su vez en la epidermis superior e inferior, mesófilo esponjoso y el área de las células del mesófilo esponjoso.

Tabla 2. Características morfométricas para cada helecho, valores promedio ± SE. Se muestra grosor de la hoja, epidermis superior, epidermis inferior, área de células mesófilo esponjoso, mesófilo esponjoso, área de células mesófilo en

empalizada, fracción del mesófilo ocupado por aire intercelular (EIA), pared celular y cutícula superior (PCS) y pared celular inferior (PCI).

Especies	Grosor hoja	Epidermis superior	Epidermis inferior	Área de células mesófilo esponjoso	Mesófilo esponjoso	Área de células mesófilo en empalizada	Mesófilo en empalizada	EIA	PCS	PCI
Agiopteris lygodiifolia	202.2±6.5^{bcd}	19.6±0.7^{bcd}	16.7±0.4^{abc}	515.6±64.2^{ab}	113.0±4.3^{abcd}	782.4±79.0	58.1±4.2^{bcd}	21.9±0.9	6.0±0.3^{ab}	3.8±0.3^{ab}
Asplenium ceterach	358.2± 7.2^{a}	33.8±0.7^{a}	17.7±1.1^{ab}	578.2±38.7^{a}	191.1±7.2^{a}	1606.4±80.5	113.2±3.6^{a}	19.6±0.6	5.2±0.2^{ab}	5.4±0.3^{a}
Astrolepis sinuata	247.8±8.1^{b}	26.6±0.8^{ab}	15.1±0.5^{abc}	301.2±23.6^{bcd}	109.9±5.7^{abcd}	542.7±32.7	98.4±4.6^{ab}	20.8±0.3	3.9±0.2^{ab}	2.9±0.1^{ab}
Bommeria hispida	298.6±7.0^{ab}	25.1±1.0^{abc}	20.4±1.2^{a}	424.9±40.3^{abc}	170.9±5.6^{a}	774.0±45.0	75.9±3.7^{abc}	22.7±0.6	6.6±0.2^{a}	3.3±0.1^{ab}
Cheilanthes eatonii	213.6±6.0^{bc}	22.0±0.9^{bc}	16.3±0.6^{abc}	312.46±35.3^{abcd}	119.2±4.6^{abc}	520.05±29.0	72.3±3.7^{abc}	27.3±0.1	4.5±0.2^{ab}	2.8±0.2^{ab}
Davallia canariensis	100.4±2.4^{de}	10.6±0.3^{de}	10.2±0.2^{bc}	95.9±14.1^{d}	40.3±1.3^{cd}	98.3±7.4	35.9±1.3^{cd}	15.9±0.4	3.0±0.1^{ab}	3.3±0.2^{ab}
Marsilea quadrifolia	57.5±2.7^{e}	7.3±0.4^{e}	6.7±0.4^{c}	75.8±59.9^{d}	24.7±1.2^{d}	1113.4±300.5	18.2±0.9^{d}	8.0±0.4	1.4±0.1^{b}	1.5±0.1^{b}
Osmunda regalis	232.9±4.4^{b}	18.9±0.6^{bcd}	18.6±0.7^{ab}	452.6±41.6^{abc}	146.9±5.0^{ab}	416±28.8	57.9±2.9^{cd}	24.5±0.6	3.7±0.1^{ab}	3.1±0.1^{ab}
Phlebodium aureum	138.2±7.7^{cde}	17.0±0.9^{cd}	19.1±1.0^{ab}	243.9±25.3^{cd}	89.2±6.1^{bcd}	183.1±22.3	16.7±1.3^{d}	25.5±3.9	4.4±0.3^{ab}	5.3±0.4^{a}
Polypodium cambricum	108.5±1.2^{de}	12.6±0.3^{de}	10.5±0.4^{abc}	127.4±10.8^{d}	58.9±3.2^{cd}	154.8±11.7	40.5±1.1^{cd}	19.0±0.4	5.3±0.7^{ab}	4.0±0.5^{ab}

Las letras en superíndice indican una diferencia significativa (P-valor <0.05) entre diferentes especies según la prueba de comparación múltiple de Tukey para cada característica.

También se obtuvieron diferentes valores significativos en la anatomía foliar y parámetros fotosintéticos de los dos grupos de helechos analizados. Tras realizar una correlación entre todas las variables anatómicas y fisiológicas, las diferencias estructurales de las diez especies de helechos están representadas en la Tabla 3. Entre todas las correlaciones, destacan el grueso de la hoja con la epidermis superior (r=0.97), con el mesófilo esponjoso (r=0.97), con el mesófilo en empalizada (r=0.9) y con el área de las células del mesófilo esponjoso (r=0.89).

Tabla 3. Matriz de correlación de Pearson de los parámetros anatómicos y fisiológicos medidos para las 10 especies de helechos. Los valores en cursiva y en negrita indican coeficientes de correlación significativos (P <0.05). Abreviaturas: grueso de la hoja (GH), epidermis superior (ES), epidermis inferior (EI), mesófilo palizado (MP), mesófilo esponjoso (ME), área de las celulas del mesófilo en empalizada (ACP), área de las células del mesófilo esponjoso (ACE), pared celular y cutícula superior (PCS), pared celular inferior (PCI), fracción del mesófilo ocupado por aire intercelular (EIA), Contenido relativo de agua (RWC), recuperación en la eficiencia fotoquímica de la hoja (FvFm), masa por área foliar (LMA), asimilación neta (A_N) y conductancia estomática (g_s).

	GH	AMP	PCI	PCS	EIA	ES	EI	ME	MP	ACE	RWC	FvFm	LMA	A_n	g_s
GH															
AMP	0.53														
PCI	0.37	0.03													
PCS	0.61	0.06	0.56												
EIA	0.51	-0.3	0.45	0.63											
ES	***0.97***	0.51	0.45	0.59	0.52										
EI	0.76	0.08	0.52	0.68	0.84	0.73									
ME	***0.97***	0.47	0.42	0.66	0.6	0.91	0.85								
MP	***0.9***	0.52	0.19	0.46	0.32	0.92	0.47	0.79							
ACE	***0.89***	0.53	0.4	0.63	0.53	0.82	0.78	0.92	0.72						
RWC	0.58	0.27	0.16	0.32	0.42	0.72	0.41	0.46	0.69	0.36					
FvFm	0.41	0.17	0.44	0.27	0.14	0.55	0.1	0.29	0.55	0.04	0.57				
LMA	0.74	0.28	0.33	0.33	0.53	0.86	0.54	0.65	0.81	0.48	0.9	0.71			
A_n	0.24	0.22	-0.48	-0.48	0.03	0.23	0.05	0.18	0.29	-0.11	0.46	0.33	0.42		
g_s	0.2	0.14	-0.62	-0.62	0.1	0.1	0.11	0.22	0.18	-	0.19	-	0.22	0.86	

Caracterización de la anatomía foliar de helechos con diferente tolerancia a la desecación:

Se observa que en los parámetros anatómicos más importantes también existen diferencias significativas entre las especies tolerantes y las sensibles a la sequía. Las DT como *Asplenium ceterach, Bommeria hispida, Astrolepis sinuata* y *Cheliantes eatonii* tienen un grueso de la hoja medio de 358.2, 298.63, 247.82 y 213.56 µm respectivamente. Si ordenamos las especies de helechos DS que tienen mayor grueso de la hoja serían las siguientes: *Osmunda regalis, Agiopteris lygodifolia, Phebodium aureum, polypodium cambricum, Davallia canariensis* y *Marsilea quadrifolia* con un grueso de la hoja medio de: 232.98, 213.56, 202.12, 138.17, 108.49, 100.41 y 57.45 µm respectivamente (Tabla 2).

Los parámetros anatómicos en los que se observaron diferencias significativas entre las especies de helechos tolerantes y las sensibles a la desecación fueron los siguientes: grueso de la hoja (P-valor=0.010), epidermis superior (P-valor=0.004), mesófilo esponjoso (P-valor=0.040) y por último mesófilo en empalizada (P-valor=0.002). Las otras variables analizadas resultaron no significativas (P-valor>0.05). Estas diferencias significativas están representadas en la gráfica (Fig. 4).

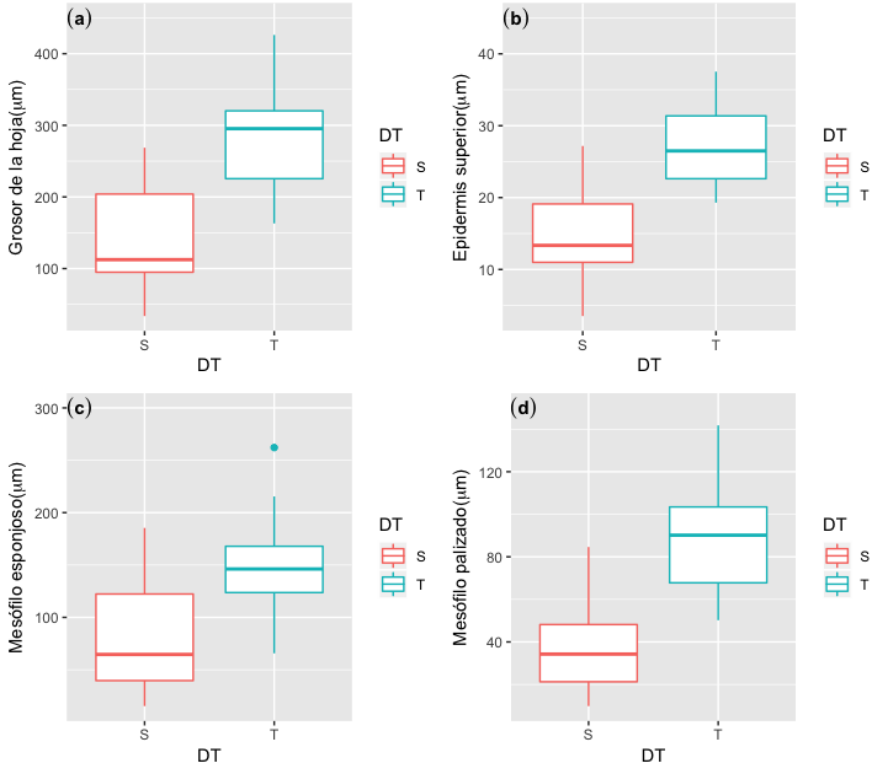

Figura 4. Grosor de la hoja (a), epidermis superior (b), mesófilo esponjoso (c), mesófilo en empalizada (d) por diferente tolerancia a la desecación (S: sensibles a la desecación; T: tolerante a la desecación). Los diagramas de cajas relacionan los parámetros con la tolerancia a la desecación la línea representa la mediana para cada grupo de helechos. Se representan las diferencias significativas obtenidas en el test estadístico ANOVA (P-valor<0.05) Sensibles a la desecación (*n=6*) y tolerantes a la desecación (*n=4*).

Tras el análisis de los parámetros que más se correlacionaban (Tabla 3), se ha procedido a evaluar el efecto de la tolerancia a la desecación en la relación de GH sobre ES, ME, MP y ACE. Las diferentes líneas de tendencia muestran como el grosor de la hoja aumenta con el incremento de ES, ME y MP. Sin embargo, con el incremento de ACE no se ha observado un aumento de GH. En el caso de ME (b), se observa una tendencia con pendiente paralela al GH pero con mayor efecto que en el caso de ACE (d) (Fig. 5).

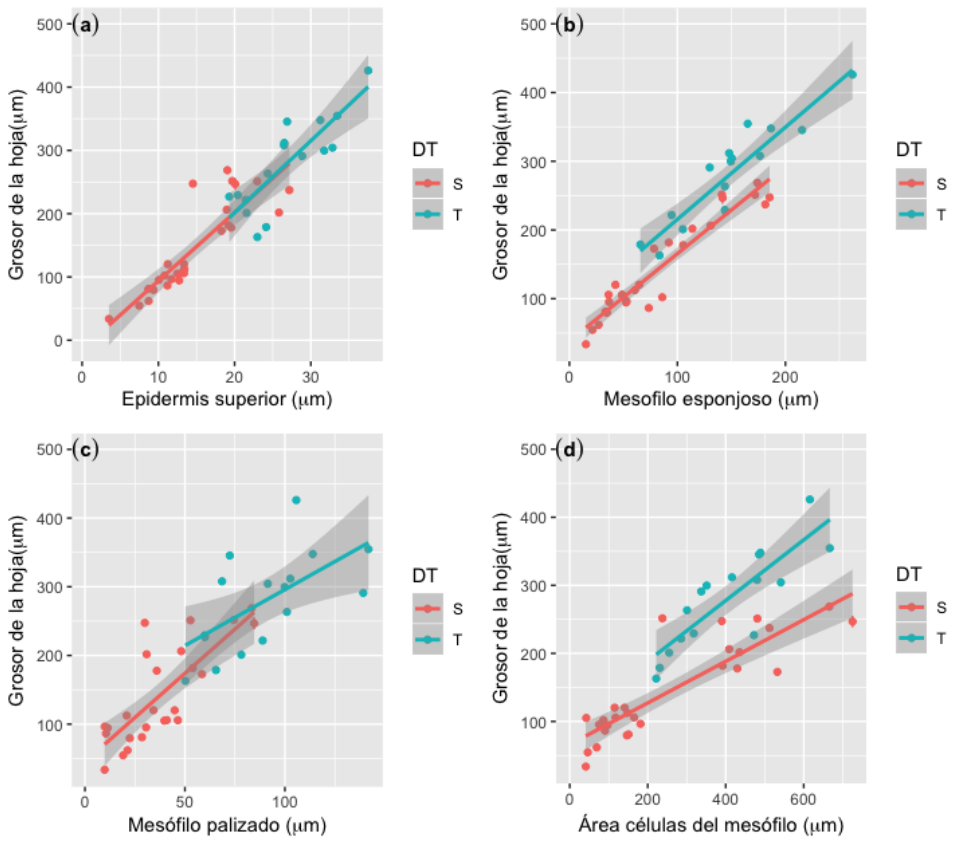

Figura 5. Relación entre del grosor de la hoja de los helechos con diferente tolerancia a la desecación (DT) y la epidermis superior (a), el mesófilo esponjoso (b), el mesófilo en empalizada (c) y el área de las células del mesófilo (d). Los valores representan el promedio de las plantas sensibles (S) y tolerantes (T), junto con su error estándar (±). El área sombreada representa el intervalo de confianza del 95%.

Comparación de la capacidad fotosintética de helechos con diferente tolerancia a la desecación:

Las especies que tuvieron unos valores elevados de fotosíntesis han sido las especies tolerantes a la desecación: *Bommeria hispida, Cheilanthes eatonii* y *Astrolepis sinuata* que han obtenido unos valores de asimilación neta: 12.97, 11.49 y 10.16 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} respectivamente. *Asplenium ceterach* ha sido de las DT que ha obtenido menor valor de asimilación neta 6.85 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}. En cambio, el helecho DS que ha obtenido un mayor valor de asimilación neta ha sido *Marsilea quadrifolia*, con un valor de asimilación neta de 9.98 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}. El resto de las especies se sitúan en un rango de asimilación neta entre: 6.85-1.81 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}. La media de los valores de asimilación neta en el conjunto de especies tolerantes a la desecación ha sido de 10.36 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} y en contraposición la media de los valores de asimilación neta en el conjunto de especies sensibles a la desecación ha sido de 5.62 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}.

La variable J_{flu} de las DS ha obtenido una media de 61.08 µmol e^- m^{-2} s^{-1}. Máximos de 93.3 µmol e^- m^{-2} s^{-1} y mínimos de 26.7 µmol e^- m^{-2} s^{-1}. En cambio, las DT tienen una media de 183.7 µmol e^- m^{-2} s^{-1}. Máximos de 265.3 µmol e^- m^{-2} s^{-1} y mínimos de 3.4 µmol e^- m^{-2} s^{-1}. La conductancia estomática no ha resultado significativa entre DS y DT (P-valor=0.148). Aunque cabe destacar, las especies DS se obtuvo una media de 0.053 mol CO_2 m^{-2} s^{-1}. Máximos de 0.089 mol CO_2 m^{-2} s^{-1} y mínimos de 0.013 mol CO_2 m^{-2} s^{-1}. Las especies DT se obtuvo una media de 0.080 mol CO_2 m^{-2} s^{-1}. Máximos de 0.115 mol CO_2 m^{-2} s^{-1} y mínimos de 0.040 mol

CO_2 m^{-2} s^{-1}.

Entre los resultados del ANOVA de un factor se observó un efecto de la tolerancia a la desecación sobre dichos parámetros (P-valor< 0.05). El efecto significante se observó en la asimilación neta (P-valor=0.023), así como el contenido relativo de agua (RWC) (P-valor=0.002), en el FvFm (P-valor=0.040), en el LMA (P-valor= 0.0008) y por último en el J_{flu} (P-valor=0.013) (Fig. 6).

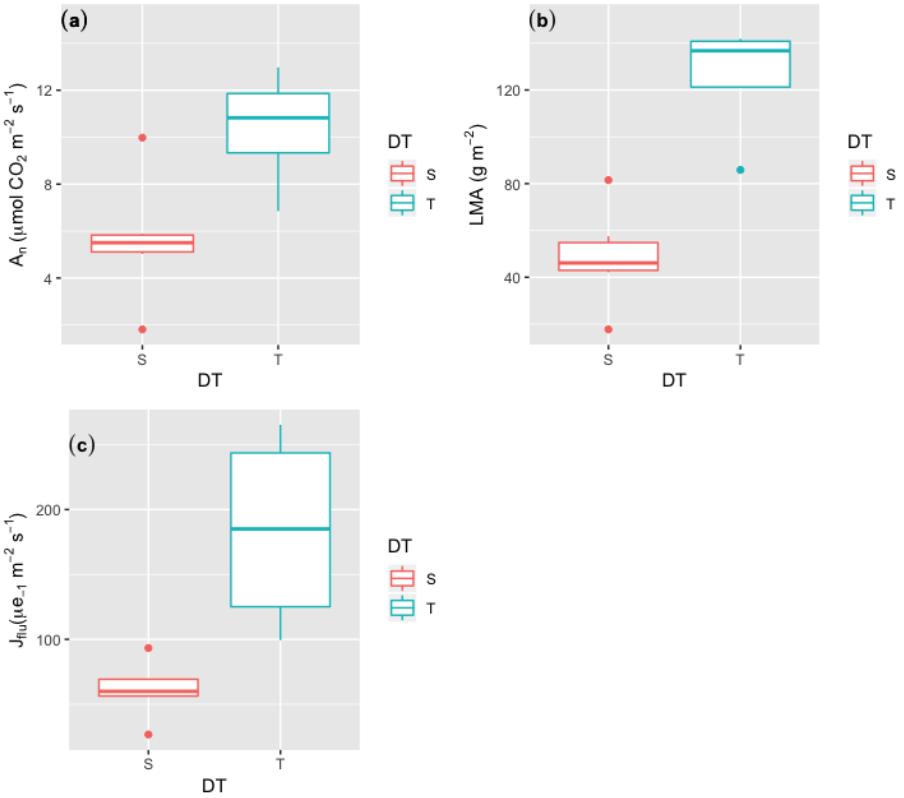

Figura 6. Diagrama de cajas que relacionan la tasa de asimilación neta (A_N; a), unidad de masa por área (LMA; b), tasa de transporte de electrones (J_{flu}; c) por la diferente tolerancia a la desecación (DT): Sensibles (S) y tolerantes (T). Se representan las diferencias significativas obtenidas en el test estadístico ANOVA (P-valor<0.05) Sensibles a la desecación (*n=6*) y tolerantes a la desecación (*n=4*).

Discusión:

En el presente trabajo se muestran resultados sobre anatomía foliar y fotosíntesis de diez especies de helechos. Seis helechos son sensibles a la desecación. Cuatro de ellos son helechos de resurrección. Cabe destacar que, respecto a las plantas tolerantes a la desecación, existen estudios sobre su funcionamiento a nivel molecular. En este trabajo se presenta un nuevo punto de vista sobre los mecanismos fisiológicos para combatir las condiciones ambientales extremas. Se aportan datos nuevos de las diferencias fisiológicas entre plantas tolerantes y sensibles a la desecación; además, es el primer estudio -al entender del autor- donde se muestran valores de fotosíntesis y anatomía en helechos tolerantes a la desecación.

Entre las características anatómicas de la hoja para la captación de luz uno de los factores importantes es la diferenciación del mesófilo en capas (mesófilo esponjoso y mesófilo en empalizada). Las células del mesófilo en empalizada se disponen en paralelo para captar la luz directamente (Vogelmann & Martin*,* 1993). Por otro lado, las células del mesófilo esponjoso son menos regulares (Evans *et al.,* 2004). Esto permite que capte más luz por unidad de clorofila (Delucia *et al.,* 1996). Las hojas con mayor grosor, como las DT, tienen más capas de mesófilo y por consiguiente la capacidad de captar más luz por área de la hoja (Evans & Poorter*,* 2001). Consecuentemente poseen un mayor contenido de Rubisco y N en la hoja por unidad de área (Roderick *et al.,* 1999). Se plantea que el mayor grosor foliar de las DT, es a su vez resultado del mayor grosor de los siguientes componentes: el grueso de la hoja, la epidermis superior, el mesófilo esponjoso, el mesófilo en empalizada. El incremento de todos estos componentes repercute en un mayor LMA. En el trabajo la media de los valores de grosor de la hoja de las DT ha sido de 279.54 µm con máximos en 358.2 µm y mínimos de 213.56 µm en cambio la media de los valores de grosor DS ha sido de 139.93 µm con máximos de 232.98µm y mínimos de 57.45 µm. Contrastando con estudios realizados en 35 especies diferentes de helechos y especies filogenéticamente próximas (Tosen *et al.,* 2016) el grueso de la hoja medio es de 177 µm, teniendo como valores máximos 386 µm y mínimos de 60.4 µm. Es decir, el grosor es el resultado del aumento de los componentes de la hoja nombrados y se observa en los valores mayores obtenidos en helechos DT.

Los valores obtenidos de A_N para las plantas tolerantes fueron 10.36 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} con unos valores máximos de 12.97 µmol CO_2 $m^{-2}s^{-1}$ y mínimos de 6.85 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}. En el caso de las plantas sensibles se observaron valores reducidos en relación a las DT con una media de 5.31 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} y valores máximos de 9.98 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} y mínimos de 1.81µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}. Los datos observados para DT fueron contrastados con estudios de Tosen *et al* (2016), en el que la media de la fotosíntesis en pteridófitos filogenéticamente próximos fue de 5.8 CO_2 m^{-1} s^{-2}. Con valores máximos de 13.7 µmol CO_2 m^{-1} s^{-2} y mínimos de 1.4 µmol de CO_2 m^{-1} s^{-2}. En hábitats caracterizados por suelos rocosos y alta exposición al sol, las especies muestran rasgos relacionados con evitar el sobrecalentamiento y la captación eficiente de nutrientes. El principal rasgo fisiológico asociados con la tolerancia a la desecación es la interrupción de la asimilación de carbono. En consecuencia, la compensación de la absorción neta pronostica una mayor tasa de asimilación en especies DT (Alcantara *et al.,* 2015). La media de los valores de LMA para las plantas las DS fue de 52.8 g m^{-2} con valores máximos de 81.5g m^{-2} y mínimos de 17.7 g m^{-2}. La media de LMA de DT fue de 501.3 g m^{-2} con valores máximos de 141.9 g m^{-2} y mínimos de 85.9 g m^{-2}. Por la tanto los

valores evidencian que en especies con menor disponibilidad de agua generalmente se obtiene un mayor LMA (Enrique *et al.,* 2016). Si se contrasta con los valores de LMA (Tosens *et al.,* 2012) obtuvieron una media de 55.5 g m^{-2}, máximos de 101.6 g m^{-2} y valores mínimos de 21 g m^{-2}. En estudios comparativos de anatomía de la hoja anteriores, se mostró que los helechos tienen un mayor grosor de la pared celular respecto a las angiospermas (Carriquí *et al.,* 2015; Tosens *et al.,* 2016), que contrastando además tienen una composición química de las paredes diferentes (Popper & Fry*,* 2004).

En el análisis elaborado, se podría recalcar que las diferencias existente entre la anatomía de las hojas de los dos grupos analizados se atribuye a las diferencias a el hábitat de procedencia. Los helechos se encuentran en la gran mayoría de regiones climáticas de la Tierra, aunque la gran parte de las especies habitan las zonas intertropicales. El hábitat característico de estas plantas son zonas húmedas, como el caso de la planta flotante de *Marsilea quadrifolia.* Por otro lado, también habitan medios secos, como es el caso de los helechos de resurrección capaces de soportar una elevada sequia atmosférica y como ya se comentó anteriormente, tras sufrir una desecación casi completa revivir cuando los niveles de agua disponible se recuperan, como el caso de *Bommeria hispida* (Gonzalez *et al.,* 2004). La disponibilidad de la luz generalmente tiene un mayor efecto que las limitaciones del agua, y las características estructurales de las hojas se vean afectadas (Tosen *et al.,* 2012). Por lo tanto, las DS son plantas de sombra donde el clima se caracteriza por densos doseles y una elevada humedad y en consecuencia como se muestra en los resultados provoca que se produzca menos materia seca y las hojas sean grandes y finas. En cambio, las DT son plantas de luz, habitan áreas donde la disponibilidad de luz es elevada los resultados han mostrado un mayor grosor foliar en las hojas como se demostró en estudios previos de Grime *et al* (1982).

En resumen, los resultados mostraron que las plantas tolerantes a la desecación tienen una mayor tasa fotosintética en comparación con las plantas que habitan zonas de sombra con abundante humedad, lo que les resulta ventajoso. Debido al hábitat y las adaptaciones a la exposición de alta irradiancia de las plantas de resurrección, estas tienen una mejor respuesta a las condiciones extremas (Creese *et al.,* 2014).
Por otro lado, los resultados muestran que las plantas tolerantes a la desecación tienen una estructura de la hoja más gruesa, debido a que el conjunto de todas las estructuras como el mesófilo esponjoso en empalizada, la epidermis superior y las células del mesófilo esponjoso son mayores, y eso posiblemente les permita mayor espacio para el aparato fotosintético y por ende realizar una mayor fotosíntesis.
Profundizando en estudios sobre la limitación en la disponibilidad de luz, se ha demostrado que esta limitación resulta en una reducción de la conductancia del mesófilo (g_m) (Hanba, Kogami & Terashima*,* 2002; Niinemets *et al.,* 2006; Ivanova *et al.,* 2008), que se refleja en un menor grosor de la hoja y en consecuencia en una menor superficie de mesófilo expuesto por área de hoja. (Terashima *et al.,* 2006).

Conclusión:

Numerosos estudios se han centrado en el análisis de las especies de resurrección (Scott *et al.,* 2000; Farrant *et al.,* 2000; Helseth *et al.,* 2005; Gaff & Oliver*,* 2013), respecto a la tolerancia a la desecación se entienden los mecanismos que actúan a nivel molecular (Oliver *et al*., 2011; Gaff & Oliver*,* 2012; Fernández-Marín *et al.*, 2016), pero la combinación de la anatomía con la capacidad fotosintética de las plantas de resurrección se ha estudiado en gimnospermas (Alcantara *et al.,* 2015). En otros grupos sigue siendo un reto para la fisiología vegetal. En este trabajo se contemplan un nuevo punto de vista con unos resultados que sugieren que las plantas de resurrección, en este caso los helechos, grupo arcaico con un gran éxito evolutivo, tienen un grosor de la hoja mayor y una mayor capacidad fotosintética. Esto les permite por tanto habitar zonas áridas en las que la irradiancia del sol toma unos valores muy elevados y ser capaces de detener su actividad completamente y reanudar la fotosíntesis con normalidad una vez ha pasado el periodo crítico. También alcanzan unos valores de fotosíntesis elevados en comparación con los helechos que habitan zonas húmedas y sombrías. Por lo tanto, el conocimiento de estas especies va a permitir implicaciones a nivel ecológico de la estrategia de resurrección.

Agradecimientos:

Me gustaría agradecer en primer lugar, al estudiante de PhD Miquel Nadal Nadal, que además de ser una persona muy agradable, trabajadora, responsable y eficaz, me ha guiado, ayudado y dado todas las directrices de manera excepcional y paciente durante la realización del trabajo, además de la realización de parte del trabajo de laboratorio. Un agradecimiento especial al Doctor Jaume Flexas Sans por el seguimiento que ha realizado del trabajo y por darme la oportunidad de introducirme en el mundo de la fisiología vegetal y de participar de manera activa en el este gran departamento de la UIB (Universidad de las Islas Baleares), gracias también a dicho departamento por el buen trato y la ayuda recibida. Así como a mis compañeros que me han apoyado y ayudado en los largos días en los que he estado realizando el análisis de las fotografías y la posterior interpretación de los datos: Aina Vázquez, Mar Gil, Aixa Leiva, Toni Tortella y Victoria Tomás.
Debo agradecer a Eduardo Rodriguez Danús, por la ayuda, la orientación y su constante apoyo durante, además de en mi formación como bióloga, en la realización de este trabajo.
Para finalizar, gracias a mi familia, a mi madre, Mª Jesús Pozuelo, a mi padre Pablo Ramis, y a mi hermana, Sandra Ramis, ya que gracias a ellos soy todo lo que soy.

Referencias:

Alcantara, S., de Mello-Silva, R., Teodoro, G. S., Drequeceler, K., Ackerly, D. D., & Oliveira, R. S. (2015). Carbon assimilation and habitat segregation in resurrection plants: a comparison between desiccation-and non-desiccation-tolerant species of Neotropical Velloziaceae (Pandanales). *Functional ecology*, *29*(12), 1499-1512

Bernacchia, G., Salamini, F., & Bartels, D. (1996). Molecular characterization of the rehydration process in the resurrection plant Craterostigma plantagineum. *Plant Physiology*, *111*(4), 1043-1050.

Brodribb, T. J., & Holbrook, N. M. (2003). Stomatal closure during leaf dehydration, correlation with other leaf physiological traits. *Plant Physiology*, *132*(4), 2166-2173.

Brodribb, T. J., Feild, T. S., & Jordan, G. J. (2007). Leaf maximum photosynthetic rate and venation are linked by hydraulics. *Plant physiology*, *144*(4), 1890-1898.

Carriquí, M., Cabrera, H. M., Conesa, M. À., Coopman, R. E., Douthe, C., Gago, J., ... & 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.

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 CO2 for diverse species grown under contrasting irradiances. *New Phytologist*, *204*(1), 92-104.

DeLucia, E. H., Nelson, K., Vogelmann, T. C., & Smith, W. K. (1996). Contribution of intercellular reflectance to photosynthesis in shade leaves. *Plant, Cell & Environment*, *19*(2), 159-170.

Enrique, G., Olmo, M., Poorter, H., Ubera, J. L., & Villar, R. (2016). Leaf mass per area (LMA) and its relationship with leaf structure and anatomy in 34 Mediterranean woody species along a water availability gradient. *PloS one*, *11*(2), e0148788.

Evans, J. R., Vogelmann, T. C., Williams, W. E., & Gorton, H. L. (2004). Chloroplast to leaf. In *Photosynthetic Adaptation* (pp. 15-41). Springer, New York, NY.

Evans, J., & Poorter, H. (2001). Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant, Cell & Environment*, *24*(8), 755-767.

Farrant, J. M. (2000). A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. *Plant Ecology*, *151*(1), 29-39.

Fernandez-Marin, Beatriz & Holzinger, Andreas & Ignacio García-Plazaola, José. (2016). Photosynthetic Strategies of Desiccation-Tolerant Organisms. Handbook of Photosynthesis, Third Edition. 719-737. 10.1201/b19498-49.

Flora of North America @ efloras.org. (2019). Retrieved from http://www.efloras.org/flora_page.aspx?flora_id=1

Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. (2019). Retrieved from http://www.floraiberica.es/

Fortunati, A., Barta, C., Brilli, F., Centritto, M., Zimmer, I., Schnitzler, J. P., & Loreto, F. (2008). Isoprene emission is not temperature-dependent during and after severe drought-stress: a physiological and biochemical analysis. *The Plant Journal*, *55*(4), 687-697.

Franks, S.J. (2011). Plasticity and evolution in drought avoidance and escape in the annual plant Brassica rapa. New Phytol 190:249–257.

Gaff, D. F., & Oliver, M. (2013). The evolution of desiccation tolerance in angiosperm plants: a rare yet common phenomenon. *Functional Plant Biology*, *40*(4), 315-328.

Grime, J. P. (1982). *Estrategias de adaptación de las plantas y procesos que controlan la vegetación* (No. Sirsi) i9789681813604.

González, T. E. D., Álvarez, M. D. C. F. C., & Prieto, J. A. F. (2004). *Curso de botánica*. Trea.

Hanba, Y. T., Kogami, H., & Terashima, I. (2002). The effect of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in Acer species differing in light demand. *Plant, Cell & Environment*, *25*(8), 1021-1030.

Helseth, L. E., & Fischer, T. M. (2005). Physical mechanisms of rehydration in Polypodium polypodioides, a resurrection plant. *Physical review E*, *71*(6), 061903.

Hikosaka, K., & Shigeno, A. (2009). The role of Rubisco and cell walls in the interspecific variation in photosynthetic capacity. *Oecologia*, *160*(3), 443-451.

Ivanova, L. A., Ivanov, L. A., Ronzhina, D. A., & P'yankov, V. I. (2008). Shading-induced changes in the leaf mesophyll of plants of different functional types. *Russian journal of plant physiology*, *55*(2), 211-219.

Moore, J. P., Le, N. T., Brandt, W. F., Driouich, A., & Farrant, J. M. (2009). Towards a systems-based understanding of plant desiccation tolerance. *Trends in plant science*, *14*(2), 110-117.

Nadal, M., Flexas, J., & Gulías, J. (2018). Possible link between photosynthesis and leaf modulus of elasticity among vascular plants: a new player in leaf traits relationships?. *Ecology letters*, *21*(9), 1372-1379.

Niinemets, Ü., & Sack, L. (2006). Structural determinants of leaf light-harvesting capacity and photosynthetic potentials. In *Progress in botany* (pp. 385-419). Springer, Berlin, Heidelberg.

Oliver, M. J., Jain, R., Balbuena, T. S., Agrawal, G., Gasulla, F., & Thelen, J. J. (2011). Proteome analysis of leaves of the desiccation-tolerant grass, Sporobolus stapfianus, in response to dehydration. *Phytochemistry*, *72*(10), 1273-1284.

Oliver, M. J., Tuba, Z., & Mishler, B. D. (2000). The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecology*, *151*(1), 85-100.

Onoda, Y., Richards, L., & Westoby, M. (2012). The importance of leaf cuticle for carbon economy and mechanical strength. *New Phytologist*, *196*(2), 441-447.

Ortiz-Ospina, E., & Roser, M. (2016). World population growth. *OurWorldInData. org*.

Pausas, J. G., & Sáez, L. (2000). Pteridophyte richness in the NE Iberian Peninsula: biogeographic patterns. *Plant ecology*, *148*(2), 195-205.

Perez-Harguindeguy, N., Diaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., ... & Urcelay, C. (2016). Corrigendum to: new handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of botany*, *64*(8), 715-716.

Popper, Z. A., & Fry, S. C. (2004). Primary cell wall composition of pteridophytes and spermatophytes. *New Phytologist*, *164*(1), 165-174.

Proctor, M. C., & Tuba, Z. (2002). Poikilohydry and homoihydry: antithesis or spectrum of possibilities?. *New Phytologist*, *156*(3), 327-349.

Proctor, M. C., Oliver, M. J., Wood, A. J., Alpert, P., Stark, L. R., Cleavitt, N. L., & Mishler, B. D. (2007). Desiccation-tolerance in bryophytes: a review. *The Bryologist*, *110*(4), 595-621.

Rascio, N., & Rocca, N. L. (2005). Resurrection plants: the puzzle of surviving extreme vegetative desiccation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *24*(3), 209-225.

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.

Roig Oliver, M. (2018). Photosynthetic and CO2 diffusion capacities in relation to phyllidia anatomy in Briophytes.

Scott, P. (2000). Resurrection plants and the secrets of eternal leaf. *Annals of Botany*, *85*(2), 159-166.

Smith, A. R., Pryer, K. M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider, H., & Wolf, P. G. (2006). A classification for extant ferns. *Taxon*, *55*(3), 705-731.

Sørensen, K. K., Lærke, P. E., Sørensen, H. B., Andersen, M. N., Kristensen, K., Münnich, C., ... & Jørgensen, U. (2018). Biomass production and water use efficiency in perennial grasses during and after drought stress. *Gcb Bioenergy*, *10*, 12-27.

Steemans, P., Le Hérissé, 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.

Terashima, I., Hanba, Y. T., Tazoe, Y., Vyas, P., & Yano, S. (2005). Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO2 diffusion. *Journal of Experimental Botany*, *57*(2), 343-354.

Tosens, T., Nishida, K., Gago, J., Coopman, R. E., Cabrera, H. M., Carriquí, M., ... & Talts, E. (2016). The photosynthetic capacity in 35 ferns and fern allies: mesophyll CO2 diffusion as a key trait. *New Phytologist*, *209*(4), 1576-1590.

Tuba, Z., Protor, C. F., & Csintalan, Z. (1998). Ecophysiological responses of homoiochlorophyllous and poikilochlorophyllous desiccation tolerant plants: a comparison and an ecological perspective. *Plant Growth Regulation*, *24*(3), 211-217.

Vogelmann, T. C., & Martin, G. (1993). The functional significance of palisade tissue: penetration of directional versus diffuse light. *Plant, Cell & Environment*, *16*(1), 65-72.

Watkins Jr, J. E., Mack, M. C., Sinclair, T. R., & Mulkey, S. S. (2007). Ecological and evolutionary consequences of desiccation tolerance in tropical fern gametophytes. *New Phytologist*, *176*(3), 708-717.

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

Zimbabweflora.co.zw. (2019). *Flora of Zimbabwe: Species information: Phlebodium aureum*. [online]Availableat:https://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/species.php?species_id=101510 [Accessed 21 Jan. 2019].