



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

**CARACTERIZACIÓN DE LOS RASGOS FOTOSINTÉTICOS E
HIDRÁULICOS DE *Phacelia secunda* J. F. Gmel. (Magnoliophyta:
Hydrophyllaceae) CRECIENDO EN CONDICIONES DE ALTA MONTAÑA**

Habilitación Profesional presentada a la Facultad de Ciencias Forestales de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de
Ingeniero en Biotecnología Vegetal

POR: Francisco Jara M.

Profesor Guía: Patricia Sáez Delgado.
Profesor Guía: Alejandra Flores Bavestrello.

Concepción, Chile 2023

© 2023

Francisco Ignacio Jara Millar

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento

CARACTERIZACIÓN DE LOS RASGOS FOTOSINTÉTICOS E HIDRÁULICOS DE
Phacelia secunda J. F. Gmel. (Magnoliophyta: Hydrophyllaceae) CRECIENDO EN
CONDICIONES DE ALTA MONTAÑA



Profesor Guía

Patricia Sáez Delgado
Profesor Asociado
Ingeniero Forestal, Dr.



Profesor Guía

Alejandra Flores Bavestrello
Profesor Asistente
Ingeniero Agrónomo, Dr.

Calificación de la Habilitación Profesional:

Patricia Sáez Delgado: 5.5

Alejandra Flores Bavestrello: 5.5

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi profesora guía, Dra. Patricia Sáez, quien me aceptó como su estudiante y me ayudó a lo largo de mi tesis con mucha paciencia.

Quiero agradecer el apoyo y la atención ofrecida por la profesora Dra. Alejandra Flores.

A los integrantes del Laboratorio de Fisiología Vegetal quiero darles gracias por toda la ayuda que me brindaron con la mejor voluntad.

Quiero agradecer a mis padres por todo el esfuerzo que han hecho para que haya podido titularme.

También agradecer el apoyo financiero de los proyectos FONDECYT 1211231 y ANILLO ACT210038.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Clima de alta montaña.....	2
1.2 Especies vegetales de alta montaña.....	5
1.3 <i>Phacelia secunda</i> J.F. Gmel. (Magnoliophyta: Hydrophyllaceae)	6
1.5 Fotosíntesis e hidráulica.....	10
1.6 Hipótesis.....	11
1.7 Objetivos	11
II. METODOLOGÍA	13
2.1 Sitio de estudio.....	13
2.2 Muestreo.....	14
2.3 Densidad foliar y masa de la hoja por el área	14
2.4 Intercambio de gases en la hoja y fluorescencia de la clorofila <i>a</i>	15
2.5 Determinación de la conductancia del mesófilo (g_m) según Harley (1992).....	16
2.6 Análisis cuantitativo de la limitación de la fotosíntesis	17
2.7 Determinación anatómica de la conductancia del mesófilo, g_m anatómica	17
2.8 Determinación de la conductancia estomática anatómica, g_s anatómica	19
2.9 Determinación de la conductancia hidráulica	21
2.10 Análisis estadístico.....	22
III. RESULTADOS.....	23

3.1 Caracterización de parámetros fotosintéticos e hidráulicos de <i>Phacelia secunda</i> J. F. Gmel.....	23
3.1.1 Densidad foliar (LD) e índice de masa foliar (LMA)	23
3.1.2 Asimilación de carbono y fotorrespiración	23
3.1.3 Velocidad máxima de la carboxilación de la Rubisco ($V_{C_{max}}$)	25
3.1.4 Conductancia estomática (g_s).....	25
3.1.5 Conductancia del mesófilo (g_m).....	25
3.1.6 Conductancia hidráulica de la hoja	26
3.1.7 Análisis cuantitativo de las limitaciones difusivas de la fotosíntesis y de la g_m	29
3.2 Correlación de la conductancia hidráulica e intercambio de gases.....	30
3.2.1 Correlaciones entre la K_{leaf} y variables de intercambio de gases	30
3.2.2 Correlaciones para los rasgos anatómicos de la hoja	31
IV. DISCUSIÓN	34
4.1 Parámetros generales.....	34
4.2 Correlación entre intercambio de gases y K_{leaf}	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla resumen de los promedios para las distintas variables observadas de <i>Phacelia secunda</i>	27
--	----

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Imágenes satelitales que ilustran el derretimiento de nieve en las últimas cuatro décadas en la Cordillera de los Andes en la Zona de Farellones, Región Metropolitana. .4	
Figura 2. Mapa de la distribución de los avistamientos de <i>Phacelia secunda</i> , entre el 2010 y el 2023 según la base de datos de Gbif (Global Biodiversity Information Facility, www.gbif.org).....7	
Figura 3. Conductancia hidráulica de la hoja Kleaf, ilustrada como un componente en un circuito electrónico análogo simplificado del sistema de toda la planta. Ksoil, Kroot, Kstem y Kplant representan, respectivamente, la conductancia hidráulica (inversa de la resistencia) del suelo, la raíz, el tallo y la planta; Ψ_{soil} , $\Psi_{stem\ xylem}$ y Ψ_{leaf} representan los potenciales de agua del suelo, el xilema del tallo y la hoja; g_s , g_b , E y VPD representan las conductancias estomáticas y de la capa límite, la tasa de transpiración y el déficit de presión de vapor de agua entre la hoja y el aire.12	
Figura 4. Mapa físico del sitio de estudio donde se realizó el muestreo de individuos y material vegetal en la cordillera de los andes, región de Farellones.14	
Figura 5. Gráficos de las curvas A_N-C_i (a) y A_N-C_c (b).24	
Figura 6. Rango de valores de los datos obtenidos de las mediciones de intercambio de gases (tomados con una C_a de $400\ \mu\text{mol CO}_2\ \text{mol}^{-1}$), mediciones anatómicas y conductancia hidráulica de la hoja28	
Figura 7. Rango de valores para medidas anatómicas. La conductancia estomática (g_s) modelada a partir de mediciones anatómicas de los estomas según Franks et al. (2009), tamaño estomático (S), densidad estomática (SD) y Grosor de la pared celular (Tcw). .29	
Figura 8. Gráfico circular con los porcentajes de los limitantes difusivos de la fotosíntesis30	
Figura 9. Correlograma de los resúmenes de A_N (AN), C_i (Ci), g_s (g_s) a una C_a de $400\ \mu\text{mol CO}_2\ \text{mol}^{-1}\ \text{aire}^{-1}$, promedios de la K_{leaf} (Kleaf) y de la densidad estomática (SD) .32	

Figura 10. Correlograma del tamaño estomático (S_s) (μm^2) y de la densidad estomática (SD) (estomas/ mm^2) en los 6 individuos de <i>Phacelia secunda</i>	33
--	----

RESUMEN

Phacelia secunda es una de las especies nativas de alta montaña más estudiadas en Chile. Su interés radica en los múltiples mecanismos que esta especie despliega para hacer frente a las duras condiciones ambientales en las que habita, y su gran distribución tanto altitudinal como latitudinal. Sin embargo, no existen estudios que caractericen de forma simultánea los mecanismos y limitaciones fotosintéticas de esta especie creciendo en campo, en conjunto con sus propiedades hidráulicas foliares, considerando además rasgos funcionales y anatómicos. El objetivo de este trabajo fue realizar una caracterización detallada de los rasgos fisiológicos y los determinantes anatómicos de conductancia hidráulica e intercambio de gases de *Phacelia secunda*. Para esto, se realizaron mediciones *in situ* de intercambio de gases y conductancia hidráulica foliar (K_{leaf}), y se colectaron muestras para el posterior análisis de los rasgos anatómicos asociados. Los resultados muestran que *Phacelia secunda* creciendo en condiciones de alta montaña (2.600 m s.n.m) no presenta una interdependencia positiva entre los rasgos hidráulicos y de intercambio de gases, si no que la K_{leaf} tiene una relación antagonista con la C_i (concentración de CO_2 subestomático). La conclusión principal es que *Phacelia secunda* en condiciones de alta montaña no presenta una interdependencia positiva entre los rasgos hidráulicos y de intercambio de gases para la asimilación de carbono, si no que la asimilación de carbono de *Phacelia secunda* en estas condiciones está determinada por la conductancia estomática, siendo la K_{leaf} una limitante para la asimilación de carbono.

Palabras clave: Alta montaña, intercambio de gases, K_{leaf} , asimilación de carbono.

ABSTRACT

Phacelia secunda is one of the most studied native high mountain species in Chile. Its interest lies in the multiple mechanisms that this species deploys to cope with the harsh environmental conditions in which it inhabits, as well as its wide altitudinal and latitudinal distribution. However, there are no studies that simultaneously characterize the photosynthetic mechanisms and limitations of this species growing in the field, along with its foliar hydraulic properties, considering both functional and anatomical traits. The objective of this study was to perform a detailed characterization of the physiological traits and anatomical determinants of hydraulic conductance and gas exchange in *Phacelia secunda*. To achieve this, *in situ* measurements of gas exchange and leaf hydraulic conductance (K_{leaf}) were conducted, and samples were collected for subsequent analysis of associated anatomical traits. The results show that *Phacelia secunda* growing under high mountain conditions (2,600 m a.s.l.) does not exhibit a positive interdependence between hydraulic and gas exchange traits. Instead, K_{leaf} shows an antagonistic relationship with C_i (substomatal CO_2 concentration). The main conclusion is that *Phacelia secunda* under high mountain conditions does not display a positive interdependence between hydraulic and gas exchange traits for carbon assimilation. Instead, carbon assimilation in *Phacelia secunda* under these conditions is determined by stomatal conductance, with K_{leaf} being a limiting factor for carbon uptake.

Keywords: High mountain, gas exchange, K_{leaf} , carbon uptake.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes desafíos que tiene que enfrentar la humanidad es entender qué medidas debemos tomar para enfrentar el inminente cambio climático. Uno de los grandes retos es conocer las consecuencias de este cambio sobre las especies vegetales, especialmente en aquellas zonas del planeta que han sido definidas como las más sensibles e impactadas por el cambio climático. Las áreas de alta montaña son la segunda zona del planeta más afectada por el cambio climático después de la Antártida. El principal efecto está dado por el incremento en la temperatura, lo que provoca, por ejemplo, pérdida de la capa de nieve, disminución en las precipitaciones, cambios en los patrones hídricos y cambios en la longitud de las estaciones de crecimiento (Pizarro-Tapia *et al.* 2011, Vuille *et al.* 2015, Adler *et al.* 2019, Körner 2021d). En Chile, las zonas de alta montaña comprenden toda la Cordillera de los Andes, que va desde la Región de Arica y Parinacota hasta la Región de Magallanes y la Antártida Chilena. Estas zonas son importantes desde varios puntos de vista, uno de ellos es que albergan un gran número de especies vegetales que se encuentran equipadas con adaptaciones fisiológicas que les permiten hacer frente a las condiciones altamente estresantes que suelen presentar los climas de este tipo. En general la vegetación de estas zonas contribuye en la conservación del agua, y la protección del suelo contra la erosión por el viento y corrientes de agua, lo que sustenta su estudio. Pero, adicionalmente, las adaptaciones presentes en este tipo de vegetación podrían ser provechosas para estudios fisiológicos que permitan entender a futuro, cómo aclimatar otros cultivos a climas adversos o desfavorables. Para entender mejor las adaptaciones fisiológicas de estas especies, se han identificado rasgos claves, como la conductancia estomática, la conductancia hidráulica y la conductancia del mesófilo, que permiten el intercambio de gases y el suministro hídrico necesario para la fotosíntesis. Respecto a las adaptaciones y rasgos fisiológicos desplegados por las especies de alta montaña, se sabe que los rasgos asociados al intercambio de gases como lo son la conductancia estomática y la conductancia del mesófilo, son clave para mantener una ganancia de carbono positiva y de este modo posibilitar su crecimiento y desarrollo. Por otro lado, respecto a los rasgos

asociados a las relaciones hídricas, se puede destacar a los estomas como fuente primaria para la pérdida de agua, y los vasos del xilema, como encargados de asegurar el suministro hídrico a todas las partes de la planta. Los vasos, la membrana celular y la pared celular representan otro conjunto de rasgos de importancia, siendo estos dos últimos limitantes de la difusión del agua y del CO₂ (Azcón-Bieto J. y M. 2013a, d, Reyes-Bahamonde *et al.* 2022). *Phacelia secunda* J. F. Gmel es una especie nativa de Chile que pertenece a los ecosistemas de alta montaña (Rodríguez *et al.* 2018). Esta especie ha mostrado a lo largo de un gradiente altitudinal variaciones en adaptaciones fisiológicas y morfológicas, las que podrían tener una influencia importante en el intercambio de gases. Sin embargo, no hay información de cómo se coordina su hidráulica con su capacidad fotosintética. Por esta razón el objetivo de este estudio fue realizar una caracterización detallada de los rasgos fisiológicos y los determinantes anatómicos de conductancia hidráulica e intercambio de gases de *Phacelia secunda* creciendo en un ambiente de alta montaña.

1.1 Clima de alta montaña

Las áreas de alta montaña poseen tipos de climas muy heterogéneos y pueden variar dependiendo de la latitud y de otros factores como, por ejemplo, su cercanía con la costa. Por esta razón es necesario especificar la localización del área en cuestión (Vuille *et al.* 2015, Körner 2021a). En Chile central, la zona de alta montaña se encuentra representada por la Cordillera de los Andes, la cual en esta latitud presenta periodos de sequía estacional en los meses estivales, producto de la fuerte influencia que ejerce el clima mediterráneo sobre ella (Cavieres *et al.* 2006). Al aumentar la elevación, también se produce una disminución adiabática de la temperatura, es decir un cambio de temperatura sin intercambio de calor con su entorno, lo cual genera un gradiente de temperatura que se refleja en la vegetación y en los distintos ecotonos que se pueden observar a medida que se asciende por la montaña. El clima de alta montaña es fuertemente afectado por el cambio climático. Otro aspecto importante de la montaña, es que la radiación solar y la velocidad del viento incrementan a medida que aumenta la elevación en la montaña, lo cual hace que, a medida que se gana altura, las condiciones se vuelven más estresantes

para la vida vegetal (Körner 2021c). En Chile, las variaciones que se han generado en esta zona montañosa de Los Andes, producto del cambio climático, se deben principalmente al aumento progresivo de la temperatura, especialmente en el sector de Farellones, donde se han registrado incrementos de temperatura desde la década de los 60. Desde 1984 hasta el 2020 se tiene registro fotográfico en el cual se puede ver una gran transformación en el área, con una notoria pérdida del permafrost (Figura 1). En la región Metropolitana se encuentra la Cuenca del Río Maipo, la cual ha sido severamente afectada por el derretimiento de nieve en las últimas décadas. Esto representa un doble problema, por una parte, no habrá suficiente agua dulce para esta zona en un futuro, y por otro lado, el calor de la radiación solar que era reflejado al espacio por el albedo de la capa de nieve, ahora será absorbido por el suelo aumentando la temperatura.

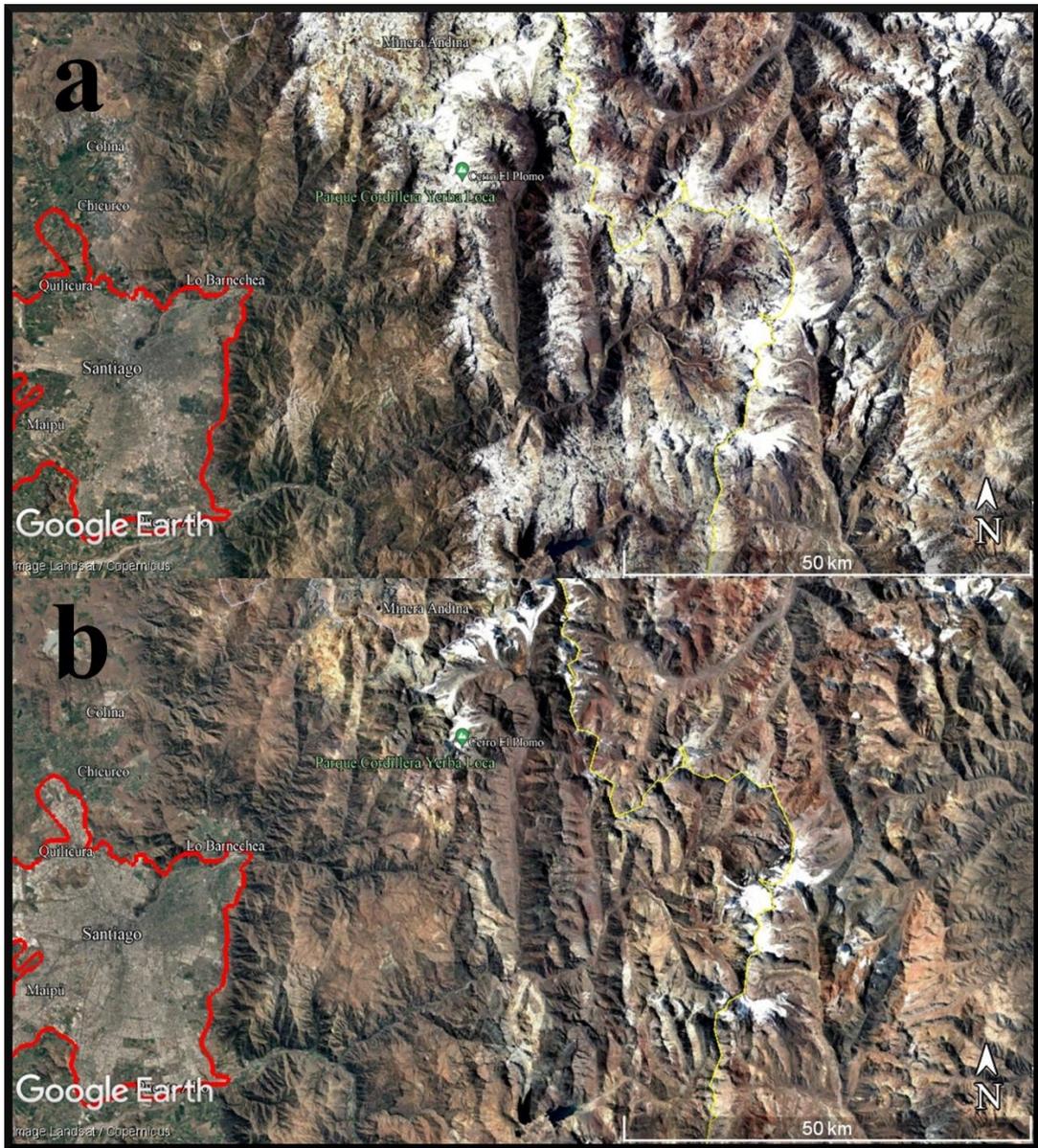


Figura 1. Imágenes satelitales que ilustran el derretimiento de nieve en las últimas cuatro décadas en la Cordillera de los Andes en la Zona de Farellones, Región Metropolitana. La imagen (a) data de diciembre del año 1984 y la imagen (b), data de diciembre del año 2020, Fuente: Google Earth, visitada el 30 de junio de 2023.

1.2 Especies vegetales de alta montaña

Las especies vegetales de alta montaña tienen que adaptarse a condiciones de vida de gran altitud. A medida que la altitud incrementa, disminuye la presión atmosférica, la concentración de dióxido de carbono, de oxígeno y la temperatura del aire. En condiciones *in situ*, la capacidad de asimilación de carbono neta (A_N) de estas especies en general, va desde los 3 hasta los 30 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Sin embargo, la mayoría de las plantas herbáceas tienen un rango que va desde los 12 hasta los 22 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Körner 2021e), lo cual representa un rango muy amplio, el cual se ve reflejado en las distintas morfologías y longevidades de las hojas de las especies que habitan la montaña. La diversidad en la morfología y longevidad se hace notoria en las estrategias que poseen las plantas de alta montaña para hacer frente a las condiciones limitantes, como baja concentración de CO_2 y baja temperatura. Dentro de la diversidad morfológica, se encuentran los patrones de crecimiento típico, de los cuales se pueden reconocer rápidamente las formas de crecimiento de cojín, roseta, graminoide, y de plantas postradas. De los rasgos anatómicos característicos de estas formas de crecimiento se puede mencionar, por ejemplo, que las plantas con forma de crecimiento de roseta y postradas aprovechan la proximidad de sus hojas con el suelo para crear bolsones de aire cálido y aprovechar el CO_2 edáfico. Las gramínoideas tienen hojas alargadas y angostas, densamente agrupadas y apretadas entre sí, para proteger el centro donde se encuentra el meristema, así también lo hacen algunas plantas con forma de roseta que poseen las hojas muy solapadas entre sí. Las plantas con forma de cojín crecen lentamente y en forma de cúpula, con sus hojas en forma de muro de escudos. De esta manera se crea una estructura que protege una cámara interior donde se resguarda la temperatura, se acumula materia orgánica y CO_2 . Sin embargo, las formas de crecimiento son por defecto para cada especie y son independientes de las condiciones ambientales (Körner 2021b), por lo que son estrategias más o menos efectivas dependiendo de la altitud en la que se encuentren en la montaña. Adicionalmente, las especies de alta montaña a menudo cuentan con modificaciones morfológicas ecotípicas, lo cual se complementa con la forma de crecimiento, y les permite aclimatarse a las condiciones ambientales cambiantes (Cavieres

2000). Las plantas que son capaces de sobrevivir a estas condiciones son objeto interesante de estudio, debido a los diversos mecanismos fisiológicos y bioquímicos que han desarrollado para adaptarse al entorno, pero además porque les ha sido necesario adaptarse a la rápida transformación que está sufriendo su entorno producto del cambio climático. Por este motivo, las especies de alta montaña pueden dar indicios de cómo enfrentar estas condiciones ambientales extremas y cómo prever los efectos del cambio climático en otros tipos de cultivos. Otro motivo que las hace importantes es que estas especies vegetales conforman un ecosistema que está detrás de la conservación de los recursos hídricos y edáficos que nos ofrecen las zonas montañosas. Estas especies se caracterizan por aportar una gran cantidad de materia orgánica al suelo montañoso a través de sus raíces, las cuales abarcan grandes extensiones de terreno, de esta manera ayudan a retener el agua en el suelo en estas zonas. A través de sus raíces también protegen el suelo de la erosión por el viento y por los flujos de agua, constituyendo un bien fundamental para la sociedad debido a que muchas ciudades y poblaciones dependen de los recursos hídricos de la montaña.

1.3 *Phacelia secunda* J.F. Gmel. (Magnoliophyta: Hydrophyllaceae)

P. secunda es una de las especies pertenecientes a los ecosistemas de alta montaña más estudiadas de Chile. Es una hierba perenne, dicotiledónea que tiene una forma de crecimiento en roseta con una inflorescencia central y hojas pubescentes. Es una planta nativa de Chile y se puede encontrar en todas sus latitudes, desde alturas que ascienden a los 3.600 m s.n.m. en la Cordillera de los Andes hasta el nivel del mar en la Cordillera de la Costa. Es posible encontrarla en regiones de Perú y Argentina (Cavieres 2000), y hasta el estado de Arizona en Estados Unidos según el registro histórico de Gbif (Global Biodiversity Information Facility) (Figura 2). Este amplio rango de distribución la hace una especie atractiva para desarrollar modelos predictivos asociados al cambio climático. Actualmente, varios mecanismos de adaptación al clima de alta montaña han sido descritos en *P. secunda*. Sin embargo, aún se desconocen algunos atributos clave asociados a sus posibles respuestas frente a condiciones ambientales cambiantes, entre

ellos están, la coordinación entre los rasgos fotosintéticos e hidráulicos y las determinantes tanto anatómicas como difusivas y bioquímicas de estos rasgos.

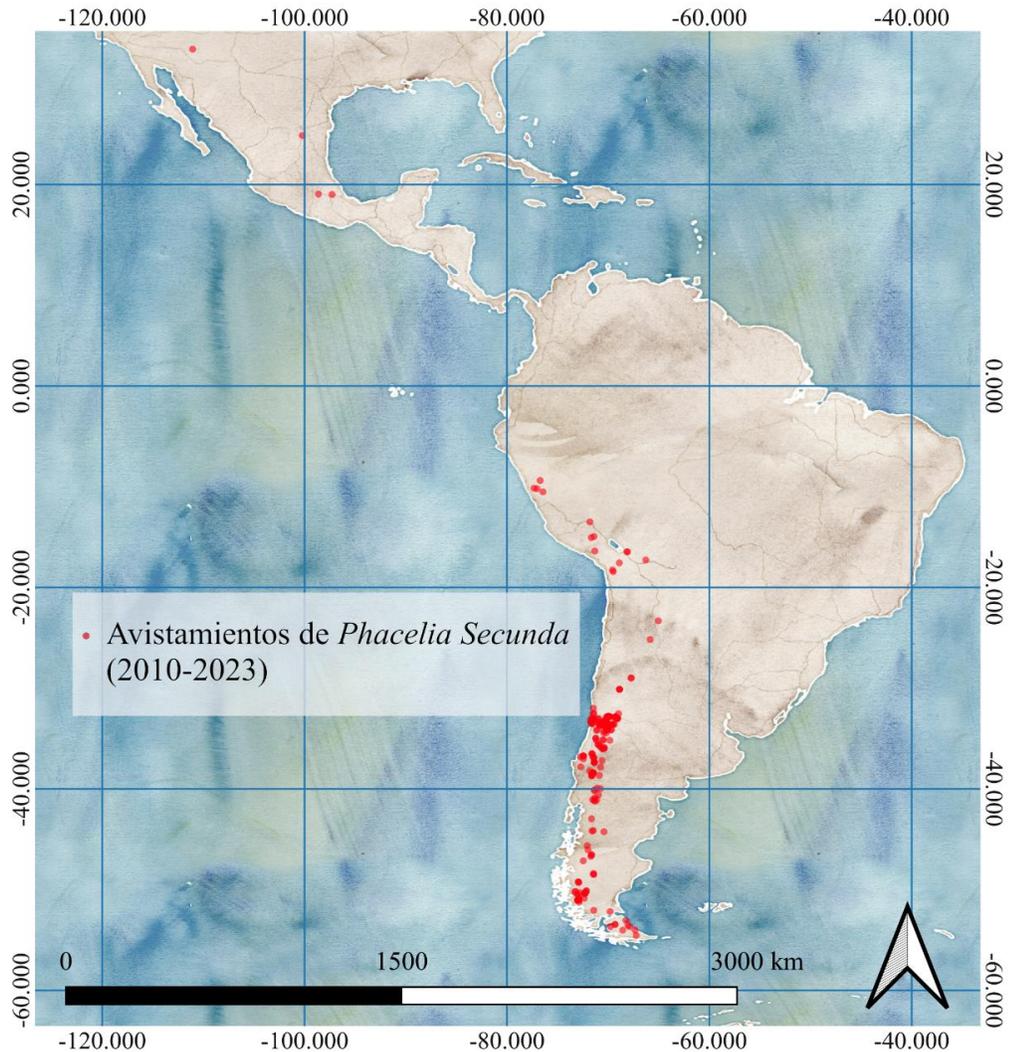


Figura 2. Mapa de la distribución de los avistamientos de *Phacelia secunda*, entre el 2010 y el 2023 según la base de datos de Gbif (Global Biodiversity Information Facility, www.gbif.org). El punto más al norte corresponde a la latitud 33° en el estado de Arizona, Estados Unidos, y el punto más al sur corresponde a la latitud -54° en Tierra del fuego, Argentina.

Entre las características de esta especie en la alta montaña se encuentran la capacidad de producir azúcares que le ayudan a mantener el equilibrio osmótico en condiciones de estrés hídrico, y también producir carbohidratos de reserva que puede almacenar en sus raíces, y de esta manera usarlos en las largas temporadas que permanece bajo nieve en la cordillera. Todos estos carbohidratos los produce en la temporada de crecimiento, y los distintos patrones de acumulación de reservas han sido descritos (Reyes-Bahamonde *et al.* 2022). Reyes-Bahamonde *et al.* (2022) reportaron que las plantas del sector de Farellones presentan concentraciones de carbohidratos menores cuando crecen una altitud de 1.600 m s.n.m. en lugar de 3.600 m s.n.m., y que esto es producto del gradiente altitudinal hídrico de la zona de Farellones. Bajo las condiciones de estrés hídrico que se encuentran a 1.600 m s.n.m., *P. secunda* presentó un drástico cierre estomático y se vio forzada a utilizar el carbono de las reservas de carbohidratos para compensar el balance negativo en la demanda de CO₂. Esto es una muestra evidente de una estrategia de evasión del estrés por déficit hídrico de *P. secunda*. En sitios de elevada altitud donde las temperaturas llegan a ser congelantes, existe el riesgo de embolia en el xilema. Este fenómeno se da debido a la insolubilidad de los gases en el hielo. Estos gases forman burbujas en el hielo, que se expanden con el aumento de la temperatura durante los deshielos, provocando así las embolias. Se ha reportado, que como mecanismo de evasión de las embolias, *P. secunda* disminuye el diámetro de sus vasos xilemáticos, sin embargo, esto disminuye el caudal de agua que se puede movilizar por ellos y aumenta también la resistencia, disminuyendo así su conductancia hidráulica foliar (K_{leaf}) (Hernández-Fuentes *et al.* (2015a). Como mecanismo compensatorio, *P. secunda* produce haces vasculares con vasos xilemáticos más numerosos, sin embargo, a pesar de esta estrategia no logra compensar la pérdida en la K_{leaf} . Esta disminución del diámetro de los vasos xilemáticos está regulado por la temperatura del lugar de crecimiento, pero no hay evidencia de que sea regulado por el potencial hídrico del suelo. Más reportes de esta especie se han realizado en los cuales se evaluó la capacidad de respuesta de esta especie a proyecciones de cambio climático mediante el aumento de la temperatura (Sanfuentes *et al.* 2012, Hernández-Fuentes *et al.* 2019). En el estudio realizado por Sanfuentes *et al.* (2012) se

utilizaron OTCs (Open Top Chambers) en dos elevaciones distintas. Estas OTCs tienen la capacidad de aumentar la temperatura del área en donde se encuentra debido a un efecto invernadero, de este modo se usaron para simular el efecto del cambio climático en un futuro cercano. En la elevación más baja (2.900 m s.n.m), donde hay menos disponibilidad hídrica, la respuesta ante el uso de OTCs fue más drástica e inmediata, con un cierre estomático rápido debido a que las OTCs causaron un efecto desecante en la planta, lo cual provocó un descenso en la tasa fotosintética. Por otro lado, en la elevación mayor (3.600 m s.n.m), la temperatura aumentó cerca de los 11°C, valor que está cerca del óptimo fotosintético de *P. secunda*, lo cual incrementó la tasa fotosintética. Las OTCs elevaron la temperatura entre 3,1°C y 3,8°C. En otro estudio realizado por Hernández-Fuentes *et al.* (2019) se sometieron a ensayos de estrés por sequía a individuos provenientes de dos altitudes diferentes en la zona de Farellones (2.700 y 3.600 m s.n.m.). Y se reportó que *P. secunda* posee memoria en individuos de altitudes más bajas de 2.700 m s.n.m., los cuales sufren sequía a largo plazo, presentando distintos patrones de respuesta al estrés por sequía dependiendo de las condiciones del lugar en donde haya crecido. Se reportó también, que posee mecanismos de fotoprotección más desarrollados en individuos que han crecido bajo estrés por sequía, que en individuos que han crecido en condiciones de mejor disponibilidad hídrica, como las que se pueden encontrar a 3.600 m s.n.m en la zona de Farellones (Hernández-Fuentes *et al.* 2015b, Hernández-Fuentes *et al.* 2019). Dado los reportes anteriores, es necesario considerar la altitud a la que se realiza el estudio de *P. secunda*, ya que ésta despliega distintos mecanismos fisiológicos dependiendo de la elevación en donde se encuentre. El conocimiento de estas y otras características, junto con las mediciones de intercambio de gases y conductancia hidráulica, es fundamental para comprender cómo se relaciona la hidráulica de *P. secunda* con el intercambio de gases y cómo estos están determinados por la anatomía. Actualmente, las interacciones entre estos rasgos de intercambio de gases y conductancia hidráulica se desconocen en esta especie, por lo que estos estudios podrían aportar información valiosa para la comprensión de su fisiología y ecología.

1.5 Fotosíntesis e hidráulica

La fotosíntesis es un proceso que depende de moléculas inorgánicas como el CO_2 y el agua (Azcón-Bieto J. y M. 2013b, d). El suministro de estos productos está limitado por la apertura y cierre estomático, y por la estructura hidráulica de la especie vegetal. Por esta razón, la fotosíntesis es altamente sensible a factores de estrés abiótico (Azcón-Bieto J. y M. 2013b, c, d). La primera variable que determina el ingreso del CO_2 al interior de la planta, es la conductancia estomática (g_s) y es definida como la capacidad máxima de difusión gaseosa de vapor de agua de la hoja (Lawson y Matthews 2020). La g_s es determinada por la densidad estomática y la apertura de los poros estomáticos. Los estomas a su vez se abren y se cierran en función de factores conocidos, por ejemplo, cuando los niveles de luz son altos, el nivel de CO_2 en el interior de la planta es bajo y/o la demanda evaporativa es baja, se produce la apertura estomática, mientras que, en los casos contrarios, se produce el cierre estomático (Azcón-Bieto J. y M. 2013d). Los estomas también se cierran en respuesta a señales fitoquímicas, ya sea por fitohormonas u otros tipos de metabolitos del mesófilo (Lawson y Matthews 2020). En base a esto se entiende que la apertura y cierre estomático podría estar a su vez, determinada por otros factores internos de la planta como lo son (a) la conductancia del mesófilo (g_m), que puede definirse como la capacidad que tiene el CO_2 para transportarse desde la cavidad subestomática hasta el estroma de los cloroplastos, (b) la conductancia hidráulica de la hoja y de la raíz (K_{leaf} y K_{root} , respectivamente) que determinan la máxima capacidad de transporte de agua de la planta y que tiene a su vez una directa correlación con la g_s , y (c) los diversos mecanismos bioquímicos de resistencia al estrés abiótico (Xiong *et al.* 2017). Además, para entender cómo se transporta el CO_2 en el interior de la hoja, también hay que entender cómo se transporta el agua a través de la hoja, ya que para llegar hasta el cloroplasto el CO_2 se transporta en fase acuosa. Es por esto que es necesario el estudio de la hidráulica y cómo ésta se relaciona con otros factores como la conductancia del mesófilo y la conductancia estomática, y cómo esta influye finalmente en la asimilación de carbono (Xiong *et al.* 2017, Xu *et al.* 2021). Para ilustrar mejor el concepto de K_{leaf} se suele emplear una analogía de un circuito eléctrico, donde el recíproco de la K_{leaf} (la

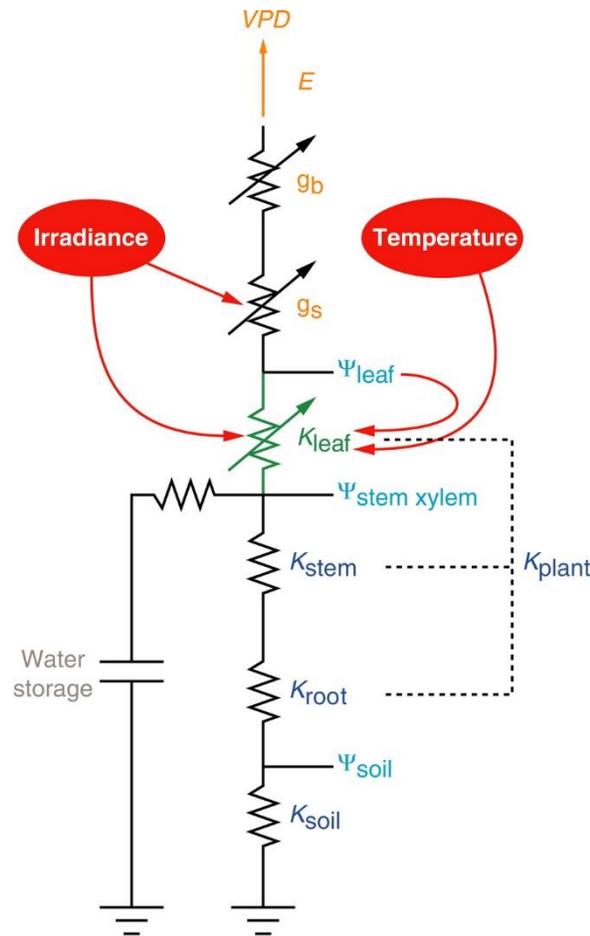
resistencia hidráulica), la diferencia entre potenciales hídricos y el caudal de agua, se expresan en función de la ley de Ohm respectivamente, como, la resistencia eléctrica, la diferencia entre potenciales eléctricos (voltaje) y el amperaje, donde cada resistencia actúa como un divisor del voltaje total, teniendo voltajes (diferencias de potenciales) distintos entre cada resistencia (Figura 3) obtenida de Sack y Holbrook (2006). En la figura 3 la g_s , la conductancia de la capa límite (g_b) y la K_{leaf} , son representadas como resistencias variables debido a que estas resistencias son modificadas por los factores microclimáticos, como lo son el déficit de vapor de agua (VPD, por sus siglas en inglés) y el potencial hídrico del suelo (Ψ_{soil}).

1.6 Hipótesis

“Existe una interdependencia entre los rasgos hidráulicos y de intercambio de gases de *Phacelia secunda*, la cual favorece la asimilación de carbono”.

1.7 Objetivos

Realizar una caracterización detallada de los rasgos fisiológicos y los determinantes anatómicos de conductancia hidráulica e intercambio de gases de *Phacelia secunda*.



A Sack L, Holbrook NM. 2006.
R Annu. Rev. Plant Biol. 57:361–81

Figura 3. Conductancia hidráulica de la hoja K_{leaf} , ilustrada como un componente en un circuito electrónico análogo simplificado del sistema de toda la planta. K_{soil} , K_{root} , K_{stem} y K_{plant} representan, respectivamente, la conductancia hidráulica (inversa de la resistencia) del suelo, la raíz, el tallo y la planta; Ψ_{soil} , $\Psi_{stem\ xylem}$ y Ψ_{leaf} representan los potenciales de agua del suelo, el xilema del tallo y la hoja; g_s , g_b , E y VPD representan las conductancias estomáticas y de la capa límite, la tasa de transpiración y el déficit de presión de vapor de agua entre la hoja y el aire. Este esquema está muy simplificado, ya que Ψ_{leaf} variará en toda la corona debido a diferencias de altura, así como diferencias en la transpiración y el suministro hidráulico a diferentes hojas. Los impactos del microclima en g_s y K_{leaf} se muestran con flechas rojas; por lo tanto, K_{leaf} , al igual que g_s y g_b , se representa como una conductancia variable; las disminuciones en Ψ_{leaf} , una variable interna, "impulsan" las disminuciones en K_{leaf} a través de su vinculación con el aumento de las tensiones del xilema. Los símbolos en zig-zag representan a una resistencia; los símbolos en zig-zag con una flecha en diagonal representan una resistencia variable; el símbolo de dos barras paralelas representa una capacitancia. Fuente: (Sack y Holbrook 2006)

II. METODOLOGÍA

2.1 Sitio de estudio

Las mediciones fotosintéticas y la colecta de tejidos se llevaron a cabo a 2.600 m s.n.m. en los Andes en las cercanías del centro de ski “La Parva” en las coordenadas 33°19'43,7”S y 70°17'33,7”O, Farellones, Región Metropolitana (Figura 4). Esta zona se caracteriza por estar fuertemente influenciada por el clima mediterráneo de Chile central, el cual se distingue por inviernos lluviosos y fríos, y por tener veranos largos (6-7 meses), secos y con altas temperaturas, donde la media anual de precipitaciones a los 2.500 m s.n.m es de 445 mm (Cavieres *et al.* 2006). Las precipitaciones caen predominantemente como nieve entre los meses de mayo y septiembre, aunque lluvias ocasionales pueden ocurrir en los meses de verano, sin embargo, las precipitaciones son más frecuentes en las elevaciones mayores. Las medias para las temperaturas durante la temporada de crecimiento son de 7°C en abril hasta 12°C en febrero a 2.600 m s.n.m. Las zonas de mayor elevación (3.600 m s.n.m) que siempre se encuentran cubiertas de nieve, la cual se derrite en los meses estivales, facilita la disponibilidad de agua en el suelo. Sin embargo en elevaciones más bajas (1.600 m s.n.m.), la capa de nieve es menor y hay una mayor limitación en la disponibilidad de hídrica del suelo. De este modo, se forma un gradiente altitudinal hídrico, donde la disponibilidad de agua aumenta a medida que se aumenta la elevación en la montaña (Cavieres 1999, Reyes-Bahamonde *et al.* 2022). Los potenciales hídricos que se pueden encontrar a 3.600 m s.n.m. en esta zona se mantienen cercanos a -0,3 MPa durante toda la estación de crecimiento que va desde noviembre hasta marzo, mientras que a 2.900 m s.n.m. este potencial disminuye a -1,6 MPa en noviembre y a -4,5 MPa en marzo (Sierra-Almeida *et al.* 2009).

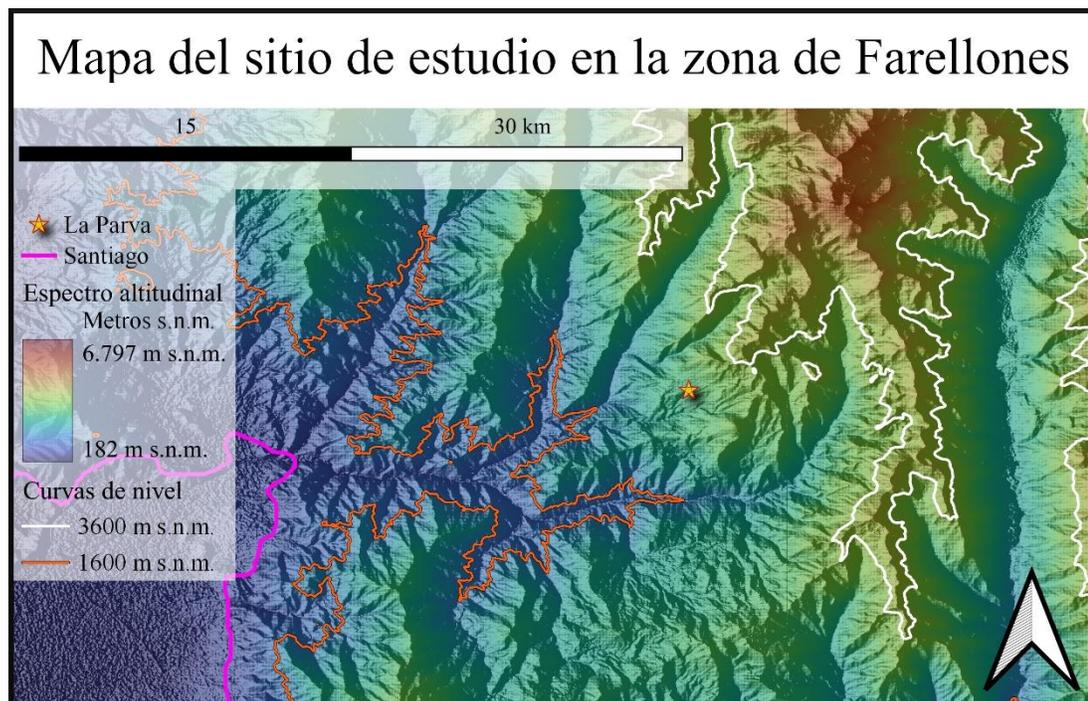


Figura 4. Mapa físico del sitio de estudio donde se realizó el muestreo de individuos y material vegetal en la cordillera de los andes, región de Farellones. La zona de muestreo se encuentra a 2.600 m s.n.m. y está ubicada en las cercanías del centro de ski “La Parva”. Fuente: www.earthdata.nasa.gov, visitada el 30 de junio de 2023.

2.2 Muestreo

Para el estudio anatómico por microscopía de *P. secunda*, se recolectaron muestras correspondientes a 6 individuos en la zona de Farellones a 2.600 m s.n.m. Las muestras consistieron en hojas que fueron tomadas a fines de noviembre y a principios de diciembre. Las muestras recolectadas fueron fijadas en FFAA (formalina - ácido acético glacial - alcohol 70°).

2.3 Densidad foliar y masa de la hoja por el área

Para calcular la densidad foliar (LD) y la masa por el área de la hoja (LMA) se colectaron hojas de 10 individuos de *P. secunda* creciendo en condiciones de alta montaña, las cuales

fueron seleccionadas aleatoriamente. Para calcular la densidad foliar (LD), el peso seco de las hojas se dividió por el volumen de la hoja, que se calculó como el producto del grosor del mesófilo de la hoja por el área de la hoja. El grosor de la hoja fue medido a partir de imágenes de cortes histológicos tomadas con un microscopio de luz (CX31, Olympus, Japan) usando un objetivo 10x, acoplado a una cámara digital de 5 mp (DC5000C, CMEX). Para obtener el índice de masa foliar por área (LMA), también llamado masa específica de la hoja, se dividió el peso seco de las hojas por el área foliar. El área foliar fue determinada a partir de fotografías de hojas tomadas con una referencia de escala de 1 cm. Para medir el área foliar y el grosor de la hoja a partir de fotografías, se usó el programa ImageJ (Wayne Rasband/NIH, Bethesda, MD, EE. UU.).

2.4 Intercambio de gases en la hoja y fluorescencia de la clorofila *a*

Las mediciones de intercambio de gases con fluorescencia de la clorofila *a* fueron realizadas con un sistema de análisis de gases infrarrojo Li-6400XT, Li6400-40 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA) unido a una cámara fluorescente en el cabezal (Li-6400-40, Li-Cor Inc.). La sensibilidad de la respuesta de la absorción de CO₂ neta (A_N) ante la variación en la concentración de CO₂ subestomático (C_i) se determinó como la pendiente inicial de las curvas A_N - C_i , tal como fue descrito por Körner y Diemer (1994). Las mediciones se realizaron en un grupo de hojas, tratando de cubrir toda el área de la cámara del IRGA, pero evitando la superposición de las hojas, con una saturación de luz PAR de 1.000 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La temperatura de las hojas fue medida con una termocupla (6400-04, Li-Cor Inc.) que toca la superficie abaxial de la hoja. Las mediciones de intercambio de gases se llevaron a cabo a una temperatura de 15°C. Para obtener los datos para realizar las curvas A_N - C_i , se dejó que las hojas alcanzaran valores de estado estacionario (típicamente después de 20 a 30 minutos de haber sujetado la hoja al cabezal del IRGA) para A_N y para la g_s a 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ en la cámara del cabezal del Li-6400 (C_a). Después de esto, C_a se disminuyó a 0 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, para subsecuentemente incrementar la concentración hasta un máximo de 2.000 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$. Las curvas A_N - C_i , consisten en mediciones tomadas después de mantener las hojas a 11 diferentes

concentraciones de C_a por al menos 5 minutos. Las correcciones por fugas de CO_2 hacia dentro o hacia fuera de la cámara del cabezal del Li-6400, fueron aplicadas a todos los datos de las mediciones de intercambio de gases, de acuerdo con lo descrito por Flexas *et al.* (2007). El fluorímetro se configuró en el pulso multifásico, que venía con la configuración del fabricante, con una intensidad de objetivo de 10 y una profundidad de rampa de un 40% (Loriaux *et al.* 2013). La eficiencia del fotosistema II (PSII) fue determinada como se muestra en la ecuación 1:

$$\phi_{PSII} = (F'_m - F_s) / F'_m \quad (1)$$

donde F_s es el estado estable de la fluorescencia en la luz (PPFD 1.000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y F'_m es la máxima fluorescencia obtenida después de un pulso de saturación de luz de 8.000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Como ϕ_{PSII} representa el número de los electrones transferidos por fotón absorbido por el PSII, la tasa de transporte de electrones (ETR) puede ser calculada como se muestra en la ecuación 2:

$$ETR = \phi_{PSII} \cdot \text{PPFD} \cdot \alpha \beta \quad (2)$$

donde α es la absorbancia de la hoja y β es la distribución de la energía absorbida entre los dos fotosistemas, que se asumió con el valor de 0,5.

2.5 Determinación de la conductancia del mesófilo (g_m) según Harley (1992)

La conductancia del mesófilo fue calculada a través de las mediciones de intercambio de gases y fluorescencia de la clorofila a , como se muestra en la ecuación 3 propuesta por Harley *et al.* (1992).

$$g_m = \frac{A_N}{C_i \cdot \frac{\Gamma \cdot (ETR + 8(A_N + R_L))}{ETR - 4(A_N + R_L)}} \quad (3)$$

donde A_N y C_i fueron obtenidos desde las mediciones de intercambio de gases a una saturación de luz de 1.000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La tasa evolutiva de CO_2 no fotorrespiratorio en la luz (R_L) fue asumida como la mitad de la tasa de respiración en la oscuridad (R_{dark}), y el punto de compensación del CO_2 (Γ^*) fue calculada de acuerdo con Brooks (1985) desde el factor de especificidad de la Rubisco ($S_{c/o}$) medido *in vitro*. Los

valores de g_m fueron usados para calcular la concentración del CO_2 cloroplastidial (C_c), convirtiendo curvas $A_N\text{-}C_i$ a curvas $A_N\text{-}C_c$, expresando C_c como se muestra en la ecuación 4.

$$C_c = C_i - (A_N / g_m) \quad (4)$$

La máxima velocidad de carboxilación de la Rubisco (V_{cmax}) se derivó desde las curvas $A_N\text{-}C_c$ de acuerdo con Farquhar *et al.* (1980).

2.6 Análisis cuantitativo de la limitación de la fotosíntesis

Para el análisis cuantitativo de las limitaciones fotosintéticas relativas, se usó el análisis propuesto por Jones (1985) tal como fue implementado por Grassi y Magnani (2005), en el cual se calculó la limitación por conductancia estomática (l_s), la limitación por difusión del mesófilo (l_m), y la limitación de la capacidad bioquímica (l_b), de tal manera que ($l_s + l_m + l_b = 1$). La limitación de los diferentes componentes fue calculada tal como se muestra en las ecuaciones 5, 6, y 7:

$$l_s = \left((g_{tot} / g_s) / (\Delta A_N / \Delta C_c) \right) / \left(g_{tot} + (\Delta A_N / \Delta C_c) \right) \quad (5)$$

$$l_m = \left((g_{tot} / g_m) (\Delta A_N / \Delta C_c) \right) / \left(g_{tot} + (\Delta A_N / \Delta C_c) \right) \quad (6)$$

$$l_b = g_{tot} / \left(g_{tot} + (\Delta A_N / \Delta C_c) \right) \quad (7)$$

donde g_s es la conductancia estomática de CO_2 , g_m es la conductancia del mesófilo de acuerdo con Harley *et al.* (1992), y g_{tot} es la conductancia total de CO_2 desde el ambiente hasta el cloroplasto (inverso multiplicativo de la suma de los inversos multiplicativos de g_s y g_m). $\Delta A_N / \Delta C_c$ fue calculado como la pendiente de la curva $A_N\text{-}C_c$, en un rango de C_c de entre 50 y 100 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$.

2.7 Determinación anatómica de la conductancia del mesófilo, g_m anatómica

Para la determinación anatómica de la conductancia del mesófilo, la porción central de la hoja de cada individuo fue colectada y fijada con una mezcla de formaldehído, etanol, ácido acético y glutaraldehído (4%). A las muestras fijadas se les sacaron micrografías

utilizando microscopia electrónica de transmisión. Nueve de 30 micrografías fueron seleccionadas aleatoriamente para medir características anatómicas de la hoja como lo son el grosor del mesófilo (T_{mes}), la superficie total del mesófilo (S), el área expuesta al espacio de aire intracelular (S_m), su razón (S_m/S), la distancia desde el cloroplasto hacia la pared celular (ΔL_{cyt}), la longitud del cloroplasto (L_{chl}), el ancho del cloroplasto (T_{chl}) y el grosor de la pared celular (T_{cw}). Todas las imágenes fueron analizadas usando el software para análisis de imágenes ImageJ (Wayne Rasband/NIH, Bethesda, MD, EE. UU.).

Las características anatómicas fueron usadas para estimar la g_m modelada como una conductancia compuesta que consiste en dos componentes, la parte gaseosa dentro de la hoja (g_{ias}) y la parte líquida (g_{liq}), de acuerdo con la difusión unidimensional, según el modelo de Niinemets y Reichstein (2003) aplicado por Tomás *et al.* (2013) que se muestra en la ecuación 8:

$$g_m = \frac{1}{\frac{1}{g_{ias}} + \frac{R \cdot T_k}{H \cdot g_{liq}}} \quad (8)$$

donde g_{ias} es la fase gaseosa de la conductancia dentro la hoja, desde la cavidad subestomática hacia la superficie exterior de la pared celular, g_{liq} es la conductancia en fase líquida y lipídica de la hoja desde el exterior de la superficie de la célula hacia el cloroplasto, R es la constante de los gases ($\text{Pa m}^3 \text{K}^{-1} \text{mol}^{-1}$), T_k es la temperatura absoluta (K), y H es la Ley de la constante de Henry para el CO_2 ($\text{Pa m}^3 \text{mol}^{-1}$). g_m es definida como una conductancia de fase gaseosa, por esta razón es necesario convertir a $H/(RT_k)$ que es la forma sin dimensiones de la ley de la constante de Henry, a g_{liq} para que corresponda a una conductancia de fase gaseosa equivalente (Niinemets y Reichstein 2003). La conductancia de la fase intracelular g_{ias} (y su recíproco, r_{ias}) fue obtenida de acuerdo con Niinemets y Reichstein (2003) como se muestra en la ecuación 9.

$$g_{ias} = (1/r_{ias}) = (D_A \cdot f_{ias}) / (\Delta L_{ias} \cdot t) \quad (9)$$

donde ΔL_{ias} es el promedio del grosor de la fase gaseosa, t es tortuosidad de la ruta de difusión (Syvertsen *et al.* 1995), D_A es la difusividad del CO_2 en el aire entre 10 y 15°C, f_{ias} es la fracción del espacio aéreo intercelular y r_{ias} es la resistencia de la fase gaseosa. ΔL_{ias} fue tomada como la mitad del grosor del mesófilo. La conductancia en fase líquida

total (g_{liq}) desde la superficie exterior de la pared celular hasta el sitio de carboxilación en el cloroplasto fue calculada como la suma de las resistencias en serie de la pared celular (r_{cw}), del plasmalema (r_{pl}) y de la resistencia dentro de la célula ($r_{cel,tot}$), tal como se muestra en la ecuación 10 (Tomás *et al.* 2013).

$$g_{liq} = S_m / \left((r_{cw} + r_{pl} + r_{cel,tot}) \cdot S \right) \quad (10)$$

La conductancia de la pared celular fue calculada tal como fue previamente descrito por Peguero-Pina *et al.* (2012). Para la conductancia de la membrana plasmática se usó un estimado de $0,0035 \text{ m s}^{-1}$ como previamente lo fue sugerido por Tosens *et al.* (2012), considerando dos diferentes rutas del CO_2 dentro de la célula, una por la pared celular en la superficie alineada con los cloroplastos y la otra para el área intercloroplastidial (Tholen *et al.* 2012). El análisis de la limitación parcial de la fase aérea (l_{ias}) de la gm, fue calculada como se muestra en la ecuación 11, tal cual como fue implementado por (Tomás *et al.* 2013).

$$l_{ias} = \frac{g_m}{g_{ias}} \quad (11)$$

2.8 Determinación de la conductancia estomática anatómica, g_s anatómica

Para llevar a cabo la determinación de la conductancia estomática g_s anatómica se realizó un proceso de diafanización, para el cual se tomó una hoja de cada una de las muestras recolectadas que fueron fijadas en FFAA. Cada hoja se puso a hervir en alcohol (96°) por diez minutos. Luego las hojas se traspasaron a una solución en ebullición de hidróxido de sodio (NaOH, 5%) mezclado con alcohol (96°) por 5 minutos. Después de esto, las hojas se lavaron 2 veces con agua para ser traspasadas a una solución de hipoclorito de sodio (50%). Las hojas se dejaron reposar en hipoclorito de sodio por 15 min hasta que quedaron completamente transparentes. Luego fueron lavadas con agua para ser fijadas con hidrato cloral (5%), el cual se les aplicó por 10 minutos (Strittmatter 1973). Antes del diafanizado se removieron los tricomas de la hoja usando una rasuradora, con la cual se rasuró con especial cuidado las zonas cercanas a la nervadura de la hoja. Esto se hizo para evitar

entrecruzamientos de tricomas en el objetivo del microscopio. Para la coloración de contraste, se dejó reposar una hoja ya diafanizada en alcohol (70°) por 10 min. Luego se traspasó la muestra a una solución de safranina (20%) diluida en alcohol (96°) y se dejó reposar 5 minutos (Strittmatter 1973). Para capturar las micrografías que se usaron para realizar las mediciones morfométricas de los estomas, se utilizó un microscopio de luz (CX31, Olympus, Japan), el cual fue acoplado a una cámara digital (DC5000C, CMEX) de 5 Mp, la cual fue operada a través del software “Image Focus 4” de la compañía Euromex, del cual se obtuvieron las escalas micrométricas para cada una de las micrografías hechas. Para medir los rasgos anatómicos de los estomas, se seleccionaron 49 micrografías provenientes de 6 individuos distintos (7 micrografías por individuos). Las micrografías se midieron con el software ImageJ (Wayne Rasband/NIH, Bethesda, MD, EE. UU.). El tamaño de los estomas (S_s , μm^2) se calculó como la longitud de la célula de guarda (S_L , μm) multiplicada por el ancho del par de células guardianas (S_w , μm) (Hasper *et al.* 2017). La densidad estomática (SD) se determinó contando el número de estomas por unidad de área epidérmica (Franks *et al.* 2009, Hasper *et al.* 2017). El índice de área estomática se obtuvo tomando el producto de SD y S_s según Galmes *et al.* (2013). Las características anatómicas de los estomas se determinaron en la sección media de la hoja tanto en la cara adaxial como en la abaxial. El cálculo de la g_s estomática se llevó a cabo como se muestra en la ecuación 12, la cual fue usada por Franks *et al.* (2009).

$$g_{w\max} = \frac{(d/v) \cdot D \cdot a_{\max}}{l + (\pi/2) \sqrt{a_{\max}/\pi}} \quad (12)$$

donde (d) es la difusividad del vapor de agua en el aire ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$), (v) es el volumen molar de aire ($\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$), (a_{\max}) corresponde al área máxima del poro y está aproximada a un área circular con un radio igual a ($S_L/4$), l corresponde a la profundidad del poro y está asumida como S_w , y la conductancia máxima del CO_2 ($g_{c\max}$) es igual a la conductancia máxima del vapor de agua ($g_{w\max}$) por un factor de conversión de $1,6^{-1}$ ($g_{c\max} = g_{w\max}/1,6$) (Franks *et al.* 2009).

2.9 Determinación de la conductancia hidráulica

Para evaluar el estado hídrico de *P. secunda*, se evaluó el contenido relativo de agua en sus hojas (RCW). Las hojas fueron cortadas y se determinó inmediatamente su peso fresco (FW). El peso túrgido (TW) fue determinado después de colocar las muestras en agua destilada en obscuridad a 4°C para minimizar la pérdida de agua por transpiración antes de llegar a un peso constante (turgencia completa, después de 24 h). Para obtener el peso seco (DW) las muestras fueron secadas en un horno durante 72 horas a 70°C. El contenido relativo de agua (RWC) fue determinado como se muestra en la ecuación 13.

$$RWC = \frac{FW - DW}{(TW - DW) \cdot 100} \quad (13)$$

Tres réplicas fueron obtenidas por individuo, y se seleccionaron 6 individuos. Para determinar la conductancia hidráulica de la hoja K_{leaf} , se utilizó una cámara de presión o Bomba Scholander, con la que se determinaron los potenciales hídricos. Las curvas presión-volumen (P-V) se realizaron siguiendo el método de transpiración libre descrito en Corcuera *et al.* (2002) y en Vilagrosa *et al.* (2003). Brevemente, se separaron 20-30 hojas de una misma planta para la construcción de una curva P-V mediante una cámara de presión (PMS-600). Se realizaron 6 curvas P-V en seis plantas diferentes. De acuerdo con los métodos propuestos por Liu y Osborne (2015), se graficaron y analizaron las curvas P-V para estimar los siguientes parámetros: potencial osmótico a plena turgencia (π_o), potencial hídrico en el punto de pérdida de turgencia ($\Psi_{t_{lp}}$), contenido relativo de agua en el punto de pérdida de turgencia ($RWC_{t_{lp}}$) y máximo módulo de elasticidad de la pared (ϵ_{max}). La conductancia hidráulica de la hoja K_{leaf} , se midió utilizando el método cinético de rehidratación descrito por Brodribb y Holbrook (2003) y siguiendo la modificación descrita en Sáez *et al.* (Datos no publicados). K_{leaf} se calculará de acuerdo con la ecuación 14:

$$k_{leaf} = \frac{C \cdot \ln [\Psi_0 / \Psi_f]}{t} \quad (14)$$

donde Ψ_0 es el potencial hídrico antes de la rehidratación, Ψ_f es el potencial hídrico después de la rehidratación, t es el tiempo de rehidratación y C es la capacitancia de la

hoja, la cual fue determinada como la pendiente inicial de las curvas presión-volumen normalizada por el área foliar (Tyree y Hammel 1972, Brodribb y Holbrook 2005).

2.10 Análisis estadístico

A cada una de las poblaciones de los valores obtenidos se les aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Para realizar las pruebas de correlaciones para los datos de intercambio de gases obtenidos con IRGA, y para los resultados de los promedios de la K_{leaf} para cada individuo, se utilizó la prueba de correlación de Spearman debido al pequeño número de réplicas que se utilizó ($n=6$). Esto para los pares ordenados de A_N , C_i , K_{leaf} , g_s y densidad estomática (SD). También se aplicó una prueba de correlación de Spearman para poblaciones no paramétricas para (SD) y el tamaño estomático (S). Para obtener la pendiente inicial de A_N-C_i se realizó una regresión lineal simple. Para obtener valores de resúmenes se obtuvieron los promedios de las variables nombradas.

III. RESULTADOS

3.1 Caracterización de parámetros fotosintéticos e hidráulicos de *Phacelia secunda* J. F. Gmel.

3.1.1 Densidad foliar (LD) e índice de masa foliar (LMA)

Los promedios de las mediciones para la masa por área foliar (LMA) y la densidad foliar (LD) fueron de 109,97 g m⁻² y de 0,34 g cm⁻³, respectivamente (Tabla 1). Los rangos para estos datos se pueden ver en la Figura 6. Al comparar los estudios realizados por Poorter *et al.* (2009) y por Zhang *et al.* (2020), los valores de LMA para *P. secunda* son en general relativamente altos, pero normales dentro del rango de plantas que habitan alturas elevadas. La densidad foliar es también, en parámetros generales, relativamente baja según los datos expuestos por Poorter *et al.* (2009) y Zhang *et al.* (2020), pero no dista mucho de los valores de las plantas que habitan a gran altitud. Los resultados de LMA y LD reflejan hojas pequeñas en superficie, pero voluminosas. Cabe destacar que para el índice de masa foliar y para el grosor de la hoja, no se tomó en cuenta el peso, ni la longitud los tricomas pubescentes presentes en la epidermis de las hojas de *P. secunda*.

3.1.2 Asimilación de carbono y fotorrespiración

El promedio de la asimilación de carbono neta A_N a una C_a de 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ fue de 30,62 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Tabla 1), lo que se considera un valor alto con respecto al rango de valores encontrados en plantas de alta montaña y también dentro del rango de un amplio espectro de especies según revisiones realizadas por Lambers y Oliveira (2019a) y Körner (2021e). La fotorrespiración (PR) fue tomada desde las lecturas de la fotosíntesis a una C_a de 0 y 3 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, y tuvo un promedio de 6,64 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Tabla 1). Este valor de la media de PR es cercano al valor de la media para PR reportado por Hernández-Fuentes *et al.* (2015b) para plantas creciendo en una altitud de 1.600 m s.n.m. en la zona de Farellones. A esa altitud también es donde se encontraron los individuos con los más bajos potenciales hídricos del tejido. El rango de valores para A_N y para PR puede verse

en la Figura 6 y el promedio para la A_{dark} se puede ver en la Tabla 1. La Pendiente A_N-C_i para *P. secunda* creciendo a 2.600 m s.n.m. fue de 0,13 (Figura 5), y presentó un valor considerablemente alto y similar a los de las plantas de alta montaña según comparaciones con los valores de las pendientes A_N-C_i reportados por Körner y Diemer (1994) para plantas de alta montaña y plantas de altitudes bajas, en un gradiente de 2.000 m. Este valor alto de la pendiente A_N-C_i da indicios de que *P. secunda* es una planta con un alto nivel de sensibilidad a los cambio de C_i y un alto nivel de adaptabilidad a distintas concentraciones de CO_2 en especial en zona con bajo nivel de CO_2 ambiental (Körner y Diemer 1994).

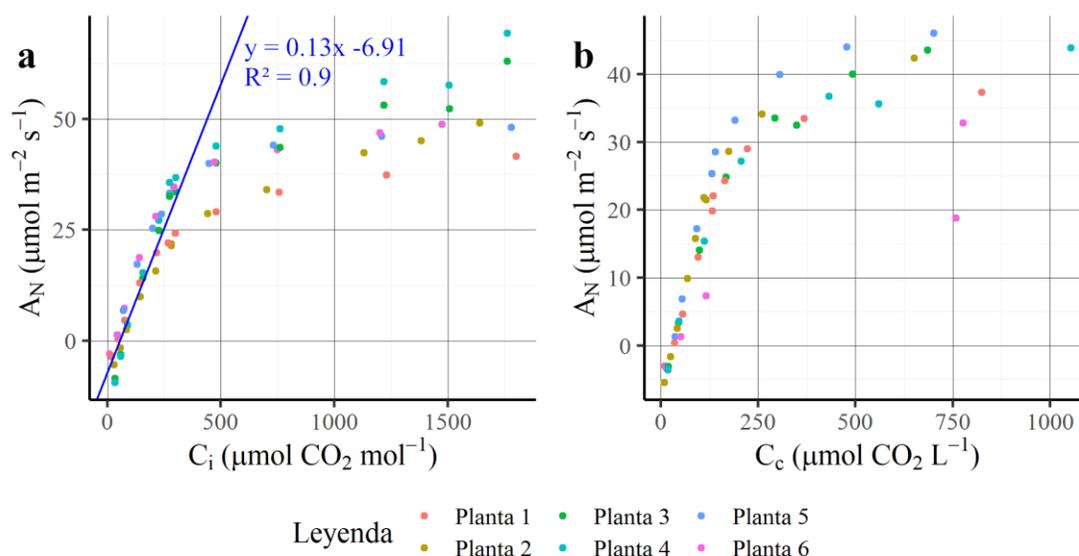


Figura 5. Gráficos de las curvas A_N-C_i (a) y A_N-C_c (b). En la imagen (a) se puede ver una recta que representa la pendiente inicial que se midió considerando los puntos que se tomaron a una C_a que va desde 0 a 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$. La pendiente de la Curva A_N-C_i representa la eficiencia de captación de CO_2 (ECU). Su pendiente y su coeficiente de determinación se pueden ver en la parte superior de la imagen (a). En la imagen (b) corresponde a la curva A_N-C_c que se utilizó para determinar la $V_{C_{\text{max}}}$ según el modelo de Farquhar et al. (1980).

3.1.3 Velocidad máxima de la carboxilación de la Rubisco (VC_{max})

El promedio de la velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco (VC_{max}) fue de 70,65 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabla 1), lo que está dentro de un valor medio bajo, con respecto al rango reportado por Tosens *et al.* (2016) y Burnett *et al.* (2019) en el cual se incluyó un amplio número de especies. Este valor bajo de VC_{max} puede sugerir una baja concentración de nitrógeno en el suelo donde crece *P. secunda*, en la zona de Farellones a 2.600 m s.n.m. (Burnett *et al.* 2019). El rango de valores para la VC_{max} puede verse en la Figura 6.

3.1.4 Conductancia estomática (g_s)

El promedio de la g_s obtenida mediante las mediciones de intercambio de gases fue de 584,26 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabla 1), lo que está dentro de un nivel medio alto, dentro del rango de g_s para varias especies, que fue reportado por Tosens *et al.* (2016) y Oliveros Díaz (2023). El rango de valores para la g_s obtenida mediante el intercambio de gases puede verse en la Figura 6. Los promedios de los rasgos anatómicos estomáticos de SD y S_s , fueron de 317,07 estomas mm^{-2} y de 456,82 μm^2 respectivamente. La g_s modelada según el método propuesto por Franks *et al.* (2009) fue de 1,25 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabla 1). Es posible que este valor esté sobreestimado debido a los altos valores de la SD, teniendo en cuenta que el modelo matemático usado se basa en una simplificación de la geometría de los estomas, lo cual puede hacer que se subestime la resistencia de la capa límite. Los resultados del rango de valores para (S_s), (SD), y g_s anatómica modelada según Franks *et al.* (2009) se pueden ver en la Figura 6.

3.1.5 Conductancia del mesófilo (g_m)

El promedio de la g_m calculada según Harley *et al.* (1992), fue de 0,23 $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabla 1), lo que se considera como un valor medio según los valores para g_m para varias especies según (Tosens *et al.* 2016). La g_m anatómica según el modelo propuesto por Tomás *et al.* (2013) fue de 0,174 $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabla 1). Este valor de la g_m anatómica es levemente bajo comparado al obtenido con el método propuesto por Harley *et al.* (1992), lo que se condice

con la pendiente evidenciada por Tomás *et al.* (2013) donde no se encontró una correlación directa entre las mediciones de la g_m anatómica y de la g_m según Harley *et al.* (1992). En cuanto al grosor de la pared celular del mesófilo (T_{cw}), según Tosens *et al.* (2016) los valores más altos de T_{cw} reportados en plantas con semillas son de alrededor de $0,75 \mu m$ en plantas de algodón, mientras que comúnmente los valores reportados oscilan entre $0,1$ y $0,5 \mu m$ en especies anuales y perennes, y la media T_{cw} en *P. secunda* es de $0,229 \mu m$ (Tabla 1), lo que además concuerda el valor de la g_m modelada según Harley *et al.* (1992), con respecto a la curva de g_m - T_{cw} descrita por Tosens *et al.* (2016). El rango de valores para T_{cw} se puede ver en la Figura 7.

3.1.6 Conductancia hidráulica de la hoja

El promedio de la conductancia hidráulica foliar K_{leaf} fue de $22,94 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ (Tabla 1), el cual está por debajo el promedio para plantas herbáceas (Sack y Holbrook 2006, Lambers y Oliveira 2019b), aunque está muy alejado de los resultados obtenidos por Hernández-Fuentes *et al.* (2015a), quien obtuvo una K_{leaf} , no superior a $6 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ para plantas de *P. secunda* creciendo a 1.600 m s.n.m. , y valores de K_{leaf} , no superiores los $3 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ a 2.900 m s.n.m. en la zona de Farellones.

Tabla 1. Tabla resumen de los promedios para las distintas variables observadas de *Phacelia secunda*.

Variable	Abreviatura	Promedio	Unidad de medida
Masa por área foliar	LMA	109,97	g m^{-2}
Densidad foliar	LD	0,34	g cm^{-3}
Asimilación de carbono neta a una C_a de $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$	A_N	30,62	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Fotorrespiración con un C_a de entre $0-3 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$	PR	6,64	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Respiración de la fase oscura	R_{dark}	1,78	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco	VC_{max}	70,65	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Conductancia estomática (intercambio de gases)	g_s	584,26	$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Conductancia estomática (modelo de Franks <i>et al.</i> 2009)	g_s	1,25	$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Conductancia del mesófilo (modelo de Harley <i>et al.</i> 1992)	g_m	0,23	$\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Conductancia del mesófilo (modelo de Tomás <i>et al.</i> 2013)	g_m	0,174	$\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Conductancia hidráulica foliar	K_{leaf}	22,94	$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$
Grosor de la pared celular	T_{cw}	0,229	μm
Tamaño estomático	S	456,82	μm^2
Densidad estomática	SD	317,07	estomas mm^{-2}

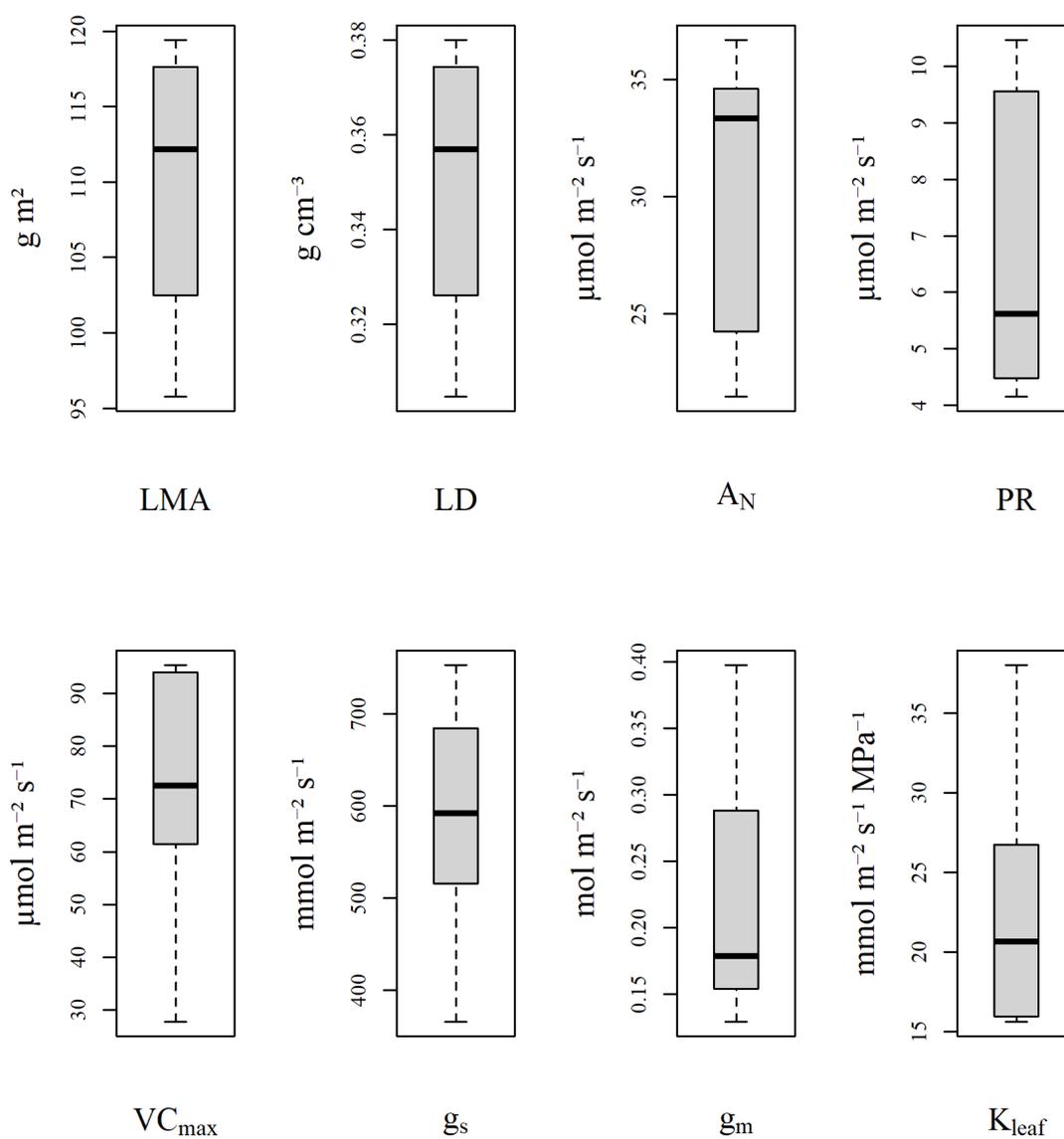


Figura 6. Rango de valores de los datos obtenidos de las mediciones de intercambio de gases (tomados con una C_a de $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$), mediciones anatómicas y conductancia hidráulica de la hoja, donde, (LMA) es la masa foliar por el área, (LD) es la densidad foliar, (A_N) es la asimilación de CO_2 , (PR) es la tasa de la fotorrespiración con medida con una C_a entre un 0 y $3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, (VC_{max}) es la máxima tasa de carboxilación de la Rubisco, (g_s) es la conductancia estomática, (K_{leaf}) es la conductancia hidráulica de la hoja y (g_m) es la conductancia del mesófilo.

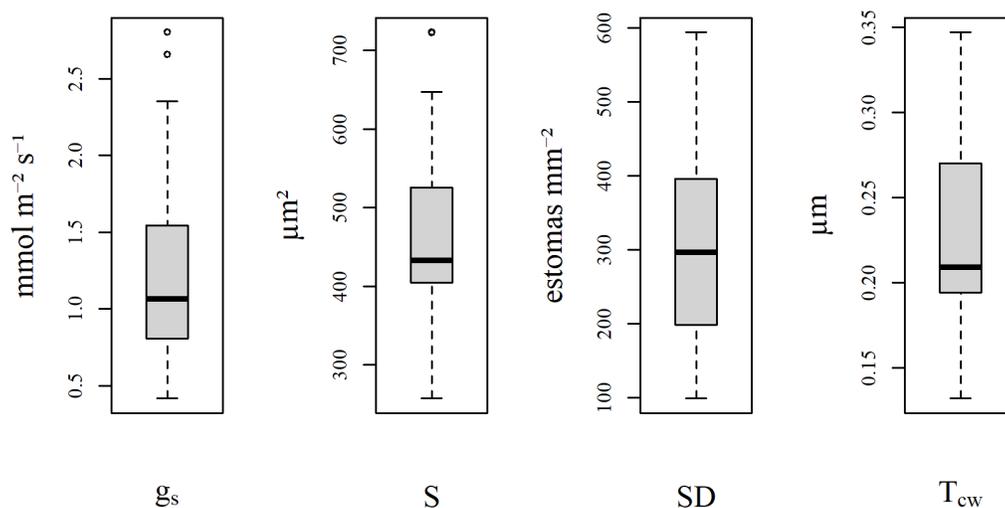


Figura 7. Rango de valores para medidas anatómicas. La conductancia estomática (g_s) modelada a partir de mediciones anatómicas de los estomas según Franks et al. (2009), tamaño estomático (S), densidad estomática (SD) y grosor de la pared celular (T_{cw}).

3.1.7 Análisis cuantitativo de las limitaciones difusivas de la fotosíntesis y de la g_m

El análisis cuantitativo de las limitaciones difusivas relativas de la fotosíntesis, reveló que la difusión estomática l_s , representó el menor obstáculo para la difusión de CO_2 con solo un 17,32%, en comparación con la colimitación de la difusión a través del mesófilo l_m , con un 43,07% y la limitación bioquímica l_b con un 39,59% (véase en la Figura 8). Sin embargo, se ha reportado que la l_s y l_m , y principalmente la l_s , es la mayor limitante de la difusión para la fotosíntesis en la mayoría de los tipos de estrés que limitan la fotosíntesis (Flexas *et al.* 2012), Aunque, en situaciones de estrés hídrico, la limitación de la l_m puede alcanzar valores elevados hasta un 75% del total (Flexas *et al.* 2012). Estos resultados obtenidos con un bajo valor relativo para l_s y un alto valor relativo para l_m y l_b pueden significar que los individuos *P. secunda* creciendo a 2.600 m s.n.m. en la zona de

Farellones, presentan bajos niveles de nitrógeno foliar (Lambers y Oliveira 2019a). El resultado del análisis parcial de la limitación de la g_m anatómica, mostró que el valor de l_{ias} es de solo un 12,93%. Este bajo porcentaje se condice con la densidad foliar, y con la relativa baja l_s .

Limitantes de la fotosíntesis

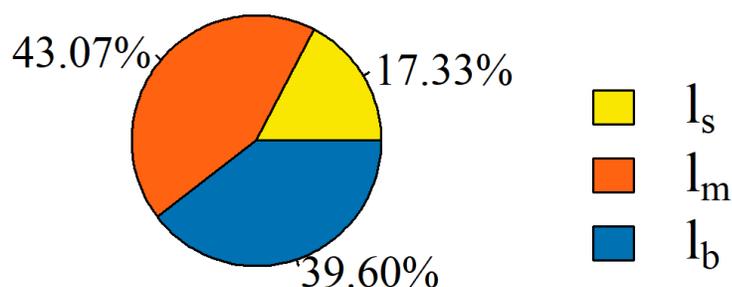


Figura 8. Gráfico circular con los porcentajes de los limitantes difusivos de la fotosíntesis, donde, (l_s) es el componente limitante de la difusión de la conductancia estomática, (l_m) limitante de la difusión de la conductancia del mesófilo y (l_b) limitante de bioquímico.

3.2 Correlación de la conductancia hidráulica e intercambio de gases

3.2.1 Correlaciones entre la K_{leaf} y variables de intercambio de gases

Sólo las variables A_N-g_s , g_s-SD y $K_{leaf}-C_i$ presentaron correlaciones significativas. Los resultados para las correlaciones entre estos parámetros se pueden ver en la Figura 9. Para las variables de A_N-g_s se obtuvo una correlación positiva con un coeficiente de correlación de 0,94 y un nivel de significancia menor al 0,01, lo que indica una fuerte determinante

anat6mica en la asimilaci6n de carbono neto (Figura 9). Este comportamiento puede ser explicado por la reducida concentraci6n de CO₂ que se encuentra a elevada altitud, por lo que la planta podr3a maximizar la entrada de CO₂ al mes6filo de la hoja a trav3s de los estomas. En cuanto a $K_{\text{leaf-C}_i}$, se obtuvo una correlaci6n negativa con un coeficiente de correlaci6n de -0,94, con un nivel de significancia menor al 0,01 (Figura 9), sin embargo, no hay evidencia estad3sticamente significativa sobre las correlaciones entre $K_{\text{leaf-g}_s}$ y $K_{\text{leaf-A}_N}$, aunque si hay leves tendencias negativas para la correlaci6n $K_{\text{leaf-g}_s}$ (Figura 9).

3.2.2 Correlaciones para los rasgos anat6micos de la hoja

Para las variables g_s -SD se obtuvo una correlaci6n positiva con un coeficiente de correlaci6n de 0,83, y un nivel de significancia menor al 0,05. Esta correlaci6n muestra que la conductancia estom3tica es fuertemente influenciada por la densidad estom3tica, tal como fue descrito por Franks *et al.* (2009), (Figura 9). En cuanto a la correlaci6n entre el tama1o estom3tico (S) con la densidad estom3tica SD, la correlaci6n es negativa con un coeficiente de -0,49, lo que tambi3n concuerda con la descripci6n hecha por Franks *et al.* (2009), en donde identific6 que a mayor densidad estom3tica, menor es el tama1o estom3tico (Figura 10), sin embargo, teniendo en cuenta los altos valores para S_s en comparaci6n con la SD seg3n lo reportado por Franks *et al.* (2009) (Tabla 1 y Figura 7), se puede afirmar que la anatom3a foliar de *P. secunda* creciendo a 2.600 m s.n.m. en la zona de Farellones, favorece la conductancia estom3tica y por lo tanto el intercambio de gases.

Matriz de correlación; Método: Spearman

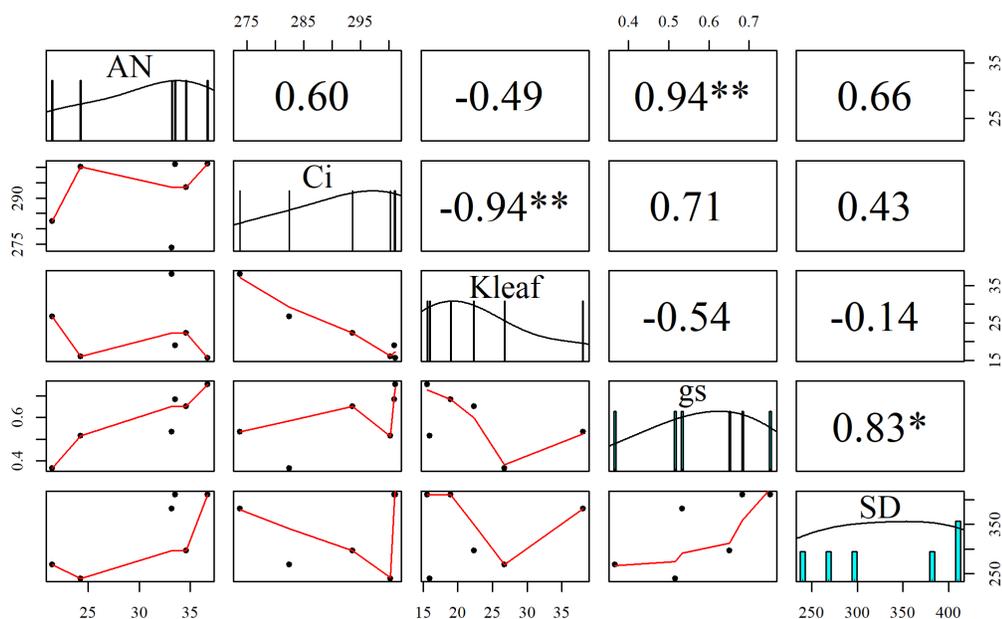


Figura 9. Correlograma de los resúmenes de A_N (AN), C_i (Ci), g_s (gs) a una C_a de $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ aire}^{-1}$, promedios de la K_{leaf} (Kleaf) y de la densidad estomática (SD) provenientes de los 6 individuos de *Phacelia secunda*. Los niveles de significancia están expresados como: “*” ($<0,05$) y “**” ($<0,01$). Se usó el método de correlación de Spearman para poblaciones no paramétricas.

Matriz de correlación; Método: Spearman

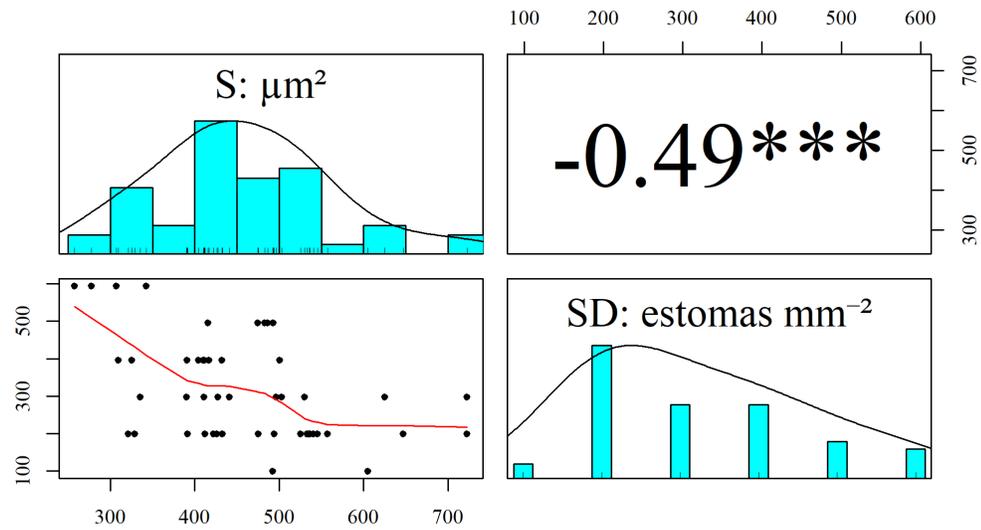


Figura 10. Correlograma del tamaño estomático (S_s) (μm^2) y de la densidad estomática (SD) ($\text{estomas}/\text{mm}^2$) en los 6 individuos de *Phacelia secunda*. El nivel de significancia esta expresado como “***”, es igual a $p\text{-value} < 0,001$. Se usó la prueba de correlación de Spearman para poblaciones no paramétricas.

IV. DISCUSIÓN

4.1 Parámetros generales

Los resultados obtenidos muestran valores relativamente altos de A_N ($30,62 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), lo cual es atribuible a que las mediciones se realizaron en condiciones óptimas para la fotosíntesis. Esto en comparación con estudios previos en los cuales individuos de *P. secunda* fueron sometidos a estrés hídrico y estrés por calor, mostrando valores que no superaron los $21 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para A_N (Sanfuentes *et al.* 2012). Sin embargo, las altas tasas de A_N también podrían ser explicadas por una priorización de la eficiencia del uso del nitrógeno fotosintético (PNUE, por sus siglas en inglés), debido a posibles bajas concentraciones de nitrógeno en el suelo (Lambers y Oliveira 2019a). Las tasas de K_{leaf} son relativamente bajas en comparación con datos generales de plantas herbáceas y se ve reflejado en el alto valor de LMA y el bajo valor para LD, los cuales permiten entrever hojas de área pequeña (Lambers y Oliveira 2019b). Por otro lado los valores de K_{leaf} fueron relativamente altos en comparación a estudios anteriores, donde las tasas de K_{leaf} solo llegaron a un máximo de $5 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$, sin embargo, esos datos de K_{leaf} fueron obtenidos mediante la aplicación de tensiones al tallo de la hoja, un método distinto al utilizado en este estudio que consistió en la aplicación de presión (Hernández-Fuentes *et al.* 2015a). Hernández-Fuentes *et al.* (2015a), estudió cómo las bajas temperaturas modifican los vasos xilemáticos para evitar la embolia, lo que hace que *P. secunda* tenga cada vez menor K_{leaf} en altitudes donde predominan las temperaturas congelantes, y una explicación a estas diferencias en los resultados podría ser que, el diámetro de los vasos del xilema de los 6 individuos de *P. secunda* analizados en este estudio es de un tamaño considerablemente mayor a los estudiados por Hernández-Fuentes *et al.* (2015a). Los resultados del análisis cuantitativo de la limitación de la difusión del CO_2 en la fotosíntesis, presentan como mayor limitante la l_m y en segundo lugar la l_b . La l_m tubo un valor relativo de 43,07%, lo que puede ser explicado por el alto valor para la g_s que tuvo un valor de $584,26 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y la alta colimitación relativa de la difusión por parte de la l_b , que se corresponde con el bajo valor de la VC_{max} , lo que además podría ser un

indicativo de un bajo nivel de nitrógeno en la hoja que pudiese favorecer que se priorice la PNUE en detrimento de la eficiencia fotosintética del uso de agua (WUE, por sus siglas en inglés), y de esta manera la g_s de cada individuo tendería a tener valores más elevados, tal como lo apunta Lambers y Oliveira (2019a). Por otro lado, aunque, las plantas con baja concentración de nitrógeno foliar en general presentan una LD alta, en condiciones de elevada altitud y con bajas concentraciones de CO_2 , en hojas que son de larga vida como en el caso de las plantas perennes, la LD tiende a ser más baja a medida que la concentración de nitrógeno foliar es menor (Lambers y Oliveira 2019a, Zhang *et al.* 2020). De esta manera la baja LD de *P. secunda* podría ser otro indicio de bajas concentraciones de nitrógeno foliar.

4.2 Correlación entre intercambio de gases y K_{leaf}

Aunque no se pudo obtener una correlación significativa entre K_{leaf} y A_N , sí se obtuvo una fuerte correlación negativa entre K_{leaf} y C_i , lo que podría ser un indicio contrario a lo propuesto en la hipótesis de esta investigación, la cual propone que existe una correlación positiva entre la conductancia hidráulica foliar y la asimilación de CO_2 . Este indicio se respalda en que A_N está positivamente correlacionado con g_s , y aunque g_s no presenta un índice de correlación significativo con C_i , sí presenta un índice de correlación alto, y además, se tiene en cuenta el alto valor de la pendiente A_N-C_i , el cual indica una alta sensibilidad de la asimilación de carbono ante una variación de la C_i , además se contempla el hecho de que físicamente el nivel de C_i que se puede encontrar en la cavidad subestomática depende en gran medida de la g_s . El cómo y el por qué la K_{leaf} se comporta de manera antagonista con la C_i , podría ser un objetivo a estudiar de esta especie en el futuro. Con respecto a lo anterior, se puede inferir tentativamente que la correlación negativa entre K_{leaf} y C_i puede ser un indicador de que a una mayor K_{leaf} la g_s disminuiría debido a una excesiva pérdida de agua por causa de una reducción de la WUE. De esta manera si eventualmente disminuye la disponibilidad hídrica del suelo, no se podría satisfacer la demanda de agua producida por el VPD. Dicho de otro modo, esto podría significar que a una mayor K_{leaf} , se produciría una mayor resistencia estomática. Siguiendo

los resultados discutidos hasta ahora y el reporte presente en el marco teórico hecho por Hernández-Fuentes *et al.* (2019), quien evaluó los efectos del estrés hídrico en individuos de *P. secunda* provenientes de distintas altitudes, se puede discernir que la poca disponibilidad hídrica del suelo es una gran limitante de la fotosíntesis en *P. secunda* y además condiciona sus respuestas de fotoprotección. Sin embargo, no existe evidencia directa de cómo afecta la poca disponibilidad hídrica del suelo a A_N , a una misma temperatura, ni tampoco se obtuvieron resultados claros para el análisis de correlación $K_{leaf}-A_N$. No obstante ya se ha informado en la literatura, que el tipo de estrategia contra el estrés hídrico que utiliza esta planta es de carácter evasivo, de manera que cuando existe un fuerte estrés hídrico *P. secunda* cierra sus estomas, y para suplir la demanda de CO_2 usa sus reservas de carbohidratos, tal como lo reportó Reyes-Bahamonde *et al.* (2022). La l_s como ya se ha discutido, es el factor que menos limita la fotosíntesis, siendo de solo un 17% limitante, y en el análisis de la g_m anatómica, la resistencia de la fase aérea es la que menos la limita, con solo un 12,93% de limitación. Lo que puede ser un indicativo de que el mayor determinante en la asimilación de carbono sería la difusión por la parte aérea de la hoja. Esto también se podría inferir desde los valores de LD y LMA, los cuales indican hojas pequeñas y voluminosas, de lo cual además se puede deducir que la estructura aerífera sería predominante en el mesófilo de la hoja. Todas estas suposiciones e inferencias apuntan a que la estrategia evasiva del estrés que presenta *P. secunda* a 2.600 m s.n.m. en la zona de Farellones, está en gran parte influenciada por las condiciones nutritivas e hídricas del suelo, y además la baja concentración de CO_2 atmosférico. Esto daría a entender que las fuertes respuestas al estrés hídrico de que presenta esta planta, se debe una WUE reducida, debido a una priorización de la PNUE (Lambers y Oliveira 2019a, Zhang *et al.* 2020), Sin embargo, no se tiene documentación de cómo se comporta la K_{leaf} según la concentración de nitrógeno en el suelo en *P. secunda*. Con respecto a la g_m se puede inferir, que, a una menor disponibilidad hídrica del suelo, el T_{cw} de las células del mesófilo podría aumentar, lo que puede hacer que disminuya marginalmente la g_m (Tosens *et al.* 2012, Tosens *et al.* 2016), sin embargo tampoco se pudo obtener una correlación para $K_{leaf}-g_m$, por lo tanto, no se puede identificar qué tan directa es la relación

de la K_{leaf} con la g_m en *P. secunda*, ni qué tan dependiente de las condiciones hídricas del suelo puede llegar a ser A_N , ni tampoco, que nivel de tolerancia a los bajos potenciales hídricos del suelo puede presentar *P. secunda* en condiciones de alta montaña. Sin embargo, si se aceptaran todos estos supuestos, significaría que, dado su tipo de hoja perenne, *P. secunda* mantiene un sistema de adaptación a los terrenos pobres en nitrógeno en altitudes elevadas donde las concentraciones de CO_2 son reducidas (Lambers y Oliveira 2019a).

V. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran que no existe una interdependencia entre los rasgos fisiológicos, hidráulicos y de intercambio de gases, que repercuta favorablemente en la asimilación de CO₂, sino más bien, que existe un antagonismo entre estos rasgos, siendo la conductancia del mesófilo un rasgo limitante de la difusión del CO₂ hacia el cloroplasto, y siendo la conductancia hidráulica, antagonista a la concentración subestomática de CO₂. Considerando el alto valor de la pendiente de las curvas A_N-C_i, que indica una gran sensibilidad fotosintética a las concentraciones subestomáticas de CO₂, la baja limitación difusiva de la conductancia estomática y la baja limitación parcial de la fase aérea en la conductancia del mesófilo, se puede concluir que la anatomía del mesófilo, y en especial la estructura aerífera tiene un impacto positivo en la asimilación de carbono, y que la conductancia estomática es el principal rasgo favorable para la asimilación de carbono en *P. secunda* en condiciones de alta montaña a una altitud de 2.600 m s.n.m. en la zona de Farellones.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Adler C., C. Huggel, B. Orlove, A. Nolin. 2019. Climate change in the mountain cryosphere: impacts and responses. *Regional Environmental Change* 19(5): 1225-1228.
2. Azcón-Bieto J., T. M. 2013a. Absorción de agua por la raíz y transporte por el xilema. Balance hídrico de la planta. pp. 57-79. En: *Fundamentos de fisiología vegetal, Part 2*(McGraw-Hill, ed).
3. Azcón-Bieto J., T. M. 2013b. El agua en la planta. Movimiento del agua en el sistema planta-suelo-atmósfera. pp. En: *Fundamentos de fisiología vegetal, Part 2*(McGraw-Hill, ed).
4. Azcón-Bieto J., T. M. 2013c. Fisiología de las plantas y el estrés. pp. 577-597. En: *Fundamentos de fisiología vegetal, (McGraw-Hill, ed)*.
5. Azcón-Bieto J., T. M. 2013d. Transpiración y control estomático. pp. 45-56. En: *Fundamentos de fisiología vegetal, Part 2*(McGraw-Hill, ed).
6. Brodribb T.J., N.M. Holbrook. 2003. Stomatal Closure during Leaf Dehydration, Correlation with Other Leaf Physiological Traits. *Plant physiology* 132(4): 2166-2173.
7. Brodribb T.J., N.M. Holbrook. 2005. Water Stress Deforms Tracheids Peripheral to the Leaf Vein of a Tropical Conifer. *Plant physiology* 137(3): 1139-1146.
8. Brooks A.F., G. D. 1985. Effect of temperature on the CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase oxygenase and the rate of respiration in the light estimates from gas-exchange measurements on spinach. *PLANTA* 165: 397-406.
9. Burnett A.C., K.J. Davidson, S.P. Serbin, A. Rogers. 2019. The “one-point method” for estimating maximum carboxylation capacity of photosynthesis: A cautionary tale. *Plant, Cell & Environment* 42(8): 2472-2481.
10. Cavieres L., Kalin Arroyo, M. 1999. Tasa de enfriamiento adiabático del aire en el valle del río Molina, Provincia de Santiago, Chile Central (33°S). *Terra Australis* n.44.
11. Cavieres L.A. 2000. Variación morfológica de *Phacelia secunda* J.F. Gmel. (Hydrophyllaceae) a lo largo de un gradiente altitudinal en Chile central. *Gayana Botánica* 57: 89-96.

12. Cavieres L.A., E.I. Badano, A. Sierra-Almeida, S. Gómez-González, M.A. Molina-Montenegro. 2006. Positive interactions between alpine plant species and the nurse cushion plant *Laretia acaulis* do not increase with elevation in the Andes of central Chile. *New Phytologist* 169(1): 59-69.
13. Corcuera L., J.J. Camarero, E. Gil-Pelegrín. 2002. Functional groups in *Quercus* species derived from the analysis of pressure–volume curves. *Trees* 16(7): 465-472.
14. Farquhar G.D., S. von Caemmerer, J.A. Berry. 1980. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *PLANTA* 149(1): 78-90.
15. Flexas J., M.M. Barbour, O. Brendel, H.M. Cabrera, M. Carriquí, A. Díaz-Espejo, C. Douthe, E. Dreyer, J.P. Ferrio, J. Gago, A. Gallé, J. Galmes, N. Kodama, H. Medrano, Ü. Niinemets, J.J. Peguero-Pina, A. Pou, M. Ribas-Carbó, M. Tomás, T. Tosens, C.R. Warren. 2012. Mesophyll diffusion conductance to CO₂: An unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Science* 193-194: 70-84.
16. Flexas J., A. Diaz-Espejo, J. Berry, J. Cifre, J. Galmes, R. Kaldenhoff, H. Medrano, M. Ribas-Carbo. 2007. Analysis of leakage in IRGA's leaf chambers of open gas exchange systems: quantification and its effects in photosynthesis parameterization. *Journal of Experimental Botany* 58(6): 1533-1543.
17. Franks P.J., D.J. Beerling, R.A. Berner. 2009. Maximum Leaf Conductance Driven by CO₂ Effects on Stomatal Size and Density over Geologic Time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(25): 10343.
18. Galmes J., J.M. Ochogavia, J. Gago, E.J. Roldan, J. Cifre, M.A. Conesa. 2013. Leaf responses to drought stress in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*: anatomical adaptations in relation to gas exchange parameters. *Plant, Cell and Environment* 36(5): 920-920-935.
19. Grassi G., F. Magnani. 2005. Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant, Cell and Environment* 28(7): 834-849.
20. Harley P.C., F. Loreto, G. Di Marco, T.D. Sharkey. 1992. Theoretical Considerations when Estimating the Mesophyll Conductance to CO₂ Flux by Analysis of the Response of Photosynthesis to CO₂. *Plant physiology* 98(4): 1429-1436.
21. Hasper T.B., M.E. Dusenge, F. Breuer, F.K. Uwizeye, G. Wallin, J. Uddling. 2017. Stomatal CO₂ responsiveness and photosynthetic capacity of tropical woody species in relation to taxonomy and functional traits. *Oecologia* 184(1): 43-43-57.

22. Hernández-Fuentes C., L.A. Bravo, L.A. Cavieres. 2015a. Conductancia hidráulica foliar y vulnerabilidad a la cavitación disminuyen con la altitud en *Phacelia secunda* J.F. Gmel. (Boraginaceae). *Gayana Botánica* 72(1): 84-93.
23. Hernández-Fuentes C., L.A. Bravo, L.A. Cavieres. 2015b. Photosynthetic responses and photoprotection strategies of *Phacelia secunda* plants exposed to experimental warming at different elevations in the central Chilean Andes. *Alpine Botany* 125(2): 87-99.
24. Hernández-Fuentes C., R.E. Coopman, L.A. Cavieres, L.A. Bravo. 2019. Photoprotective strategies against drought are depending on the elevation provenance in *Phacelia secunda*. *Alpine Botany* 129(2): 123-135.
25. Jones H.G. 1985. Partitioning stomatal and non-stomatal limitations to photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 8(2): 95-104.
26. Körner C. 2021a. Alpine climate. pp. 53-64. En: *Alpine Plant Life: Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems*, Springer International Publishing. Cham.
27. Körner C. 2021b. The alpine life zone. pp. 23-51. Springer International Publishing.
28. Körner C. 2021c. The climate plants experience. pp. 65-88. En: *Alpine Plant Life: Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems*, (Körner C., ed) Springer International Publishing. Cham.
29. Körner C. 2021d. Global change at high elevation. pp. 451-483. En: *Alpine Plant Life: Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems*, (Körner C., ed) Springer International Publishing. Cham.
30. Körner C. 2021e. Uptake and loss of carbon. pp. 269-308. En: *Alpine Plant Life: Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems*, (Körner C., ed) Springer International Publishing. Cham.
31. Körner C., M. Diemer. 1994. Evidence that Plants from High Altitudes Retain their Greater Photosynthetic Efficiency Under Elevated CO₂. *Functional Ecology* 8(1): 58-68.
32. Lambers H., R.S. Oliveira. 2019a. Photosynthesis, Respiration, and Long-Distance Transport: Photosynthesis. pp. 11-114. Springer International Publishing.
33. Lambers H., R.S. Oliveira. 2019b. Plant Water Relations. pp. 187-263. Springer International Publishing.
34. Lawson T., J. Matthews. 2020. Guard Cell Metabolism and Stomatal Function. *Annual Review of Plant Biology* 71(1): 273-302.

35. Liu H., C.P. Osborne. 2015. Water relations traits of C₄ grasses depend on phylogenetic lineage, photosynthetic pathway, and habitat water availability. *Journal of Experimental Botany* 66(3): 761.
36. Loriaux S.D., T.J. Avenson, J.M. Welles, D.K. McDermitt, R.D. Eckles, B. Riensche, B. Genty. 2013. Closing in on maximum yield of chlorophyll fluorescence using a single multiphase flash of sub-saturating intensity. *Plant, Cell & Environment* 36(10): 1755-1770.
37. Niinemets Ü., M. Reichstein. 2003. Controls on the emission of plant volatiles through stomata: A sensitivity analysis. *Journal of Geophysical Research* 108(D7).
38. Oliveros Díaz M. 2023. La conductancia estomática (gs), importancia función y factores de influencia. medición de la conductancia estomática (gs) a través del porómetro de difusión estable en diferentes cultivos. *Cosmoagro*; [Online 02/13].
39. Peguero-Pina J., J. Flexas, G. J. U. Niinemets, D. Sancho-Knapik, G. Barredo, D. Villarroya, Gil-Pelegrin. 2012. Leaf anatomical properties in relation to differences in mesophyll conductance to CO₂ and photosynthesis in two related Mediterranean *Abies* species. *Plant, Cell & Environment* 35: 2121–2129.
40. Pizarro-Tapia R., C. Cabrera-Jofre, C. Morales-Calderón, J.P. Flores-Villanelo. 2011. Variación temporal de las precipitaciones y caudales en la cuenca del Maipo, y la potencial influencia glaciaria en la producción de agua (1963-2006). *Tecnología y ciencias del agua* 2: 05-19.
41. Poorter H., Ü. Niinemets, L. Poorter, I.J. Wright, R. Villar. 2009. Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytologist* 182(3): 565-588.
42. Reyes-Bahamonde C., F.I. Piper, L.A. Cavieres. 2022. Elevational variation of the seasonal dynamic of carbohydrate reserves in an alpine plant of Mediterranean mountains. *Alpine Botany*.
43. Rodríguez R., C. Marticorena, D. Alarcón, C. Baeza, L. Cavieres, V.L. Finot, N. Fuentes, A. Kiessling, M. Mihoc, A. Pauchard, E. Ruiz, P. Sanchez, A. Marticorena. 2018. Catálogo de las plantas vasculares de Chile. *Gayana Botánica* 5(1): 1-430.
44. Sack L., N.M. Holbrook. 2006. LEAF HYDRAULICS. *Annual Review of Plant Biology* 57(1): 361-381.

45. Sanfuentes C., A. Sierra-Almeida, L.A. Cavieres. 2012. Efecto del aumento de la temperatura en la fotosíntesis de una especie alto-andina en dos altitudes. *Gayana Botánica* 69: 37-45.
46. Sierra-Almeida A., L.A. Cavieres, L. Bravo. 2009. Freezing resistance varies within the growing season and with elevation in high-Andean species of central Chile. *New Phytologist* 182: 461-468.
47. Strittmatter C.G.D.D. 1973. Nueva técnica de diafanización. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*.
48. Syvertsen J., J. Lloyd, C. McConchie, P. Kriedemann, G. Farquhar. 1995. On the relationship between leaf anatomy and CO₂ diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. *Plant, Cell & Environment* 18: 149–157.
49. Tholen D., G. Ethier, B. Genty, S. Pepin, X. Zhu. 2012. Variable mesophyll conductance revisited: theoretical background and experimental implications. *Plant, Cell & Environment* 35: 2087–2103.
50. Tomás M., J. Flexas, L. Copolovici, J. Galmés, L. Hallik, H. Medrano, M. Ribas-Carbó, T. Tosens, V. Vislap, Ü. Niinemets. 2013. Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO₂ across species: quantitative limitations and scaling up by models. *Journal of Experimental Botany* 64(8): 2269-2281.
51. Tosens T., U. Niinemets, M. Westoby, I. Wright. 2012. 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.
52. Tosens T., K. Nishida, J. Gago, R.E. Coopman, H.M. Cabrera, M. Carriquí, L. Laanisto, L. Morales, M. Nadal, R. Rojas, E. Talts, M. Tomas, Y. Hanba, Ü. Niinemets, J. Flexas. 2016. The photosynthetic capacity in 35 ferns and fern allies: mesophyll CO₂ diffusion as a key trait. *New Phytologist* 209(4): 1576-1590.
53. Tyree M.T., H.T. Hammel. 1972. The measurement of the turgor pressure and the water relations of plants by the pressure-bomb technique. *Exp Bot* 23: 267–282.
54. Vilagrosa A., J. Bellot, V.R. Vallejo, E. Gil-Peigrín. 2003. Cavitation, stomatal conductance, and leaf dieback in seedlings of two co-occurring Mediterranean shrubs during an intense drought. *Journal of Experimental Botany* 54(390): 2015.
55. Vuille M., E. Franquist, R. Garreaud, W.S. Lavado Casimiro, B. Cáceres. 2015. Impact of the global warming hiatus on Andean temperature. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 120(9): 3745-3757.

56. Xiong D., J. Flexas, T. Yu, S. Peng, J. Huang. 2017. Leaf anatomy mediates coordination of leaf hydraulic conductance and mesophyll conductance to CO₂ in *Oryza*. *New Phytologist* 213(2): 572-583.
57. Xu H., H. Wang, I.C. Prentice, S.P. Harrison, I.J. Wright. 2021. Coordination of plant hydraulic and photosynthetic traits: confronting optimality theory with field measurements. *New Phytologist* 232(3): 1286-1296.
58. Zhang L., L. Yang, W. Shen. 2020. Dramatic altitudinal variations in leaf mass per area of two plant growth forms at extreme heights. *Ecological Indicators* 110: 105890.