



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y DE LA  
CONSERVACIÓN DE LA NATURALEZA**

**ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES**

**DEPARTAMENTO DE GESTIÓN FORESTAL Y SU MEDIO  
AMBIENTE**

---

**LIMITACIONES DIFUSIONALES Y BIOQUÍMICAS A LA  
FOTOSÍNTESIS EN TRES ESPECIES DEL BOSQUE ESCLERÓFILO**

Memoria para optar al Título

Profesional de Ingeniero Forestal

**CARLA BRITO ECHEVERRÍA**

Profesor Guía: Dr. Horacio Bown Intveen. Ingeniero Forestal

---

Santiago, Chile

2013

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y DE LA**  
**CONSERVACIÓN DE LA NATURALEZA**  
**ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES**  
**DEPARTAMENTO DE GESTIÓN FORESTAL Y SU MEDIO**  
**AMBIENTE**

---

**LIMITACIONES DIFUSIONALES Y BIOQUÍMICAS A LA**  
**FOTOSÍNTESIS EN TRES ESPECIES DEL BOSQUE ESCLERÓFILO**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Ingeniero Forestal

**CARLA BRITO ECHEVERRÍA**

Calificaciones:	Nota	Firma
Prof. Guía Sr. Horacio Bown Intveen	7,0	.....
Prof. Consejero Srta. Karen Peña Rojas	7,0	.....
Prof. Consejero Sr. Juan Caldentey Pont	6,5	.....

*Dedicado a mis padres, pilares fundamentales de mi vida. A mis amigas incondicionales por todo el apoyo, confianza y alegrías. A mi estimado profesor guía por la confianza depositada.*

*Dedicado con mucho amor a mis dos hombres, el impulso final en esta etapa y del resto de mi vida.*

*Muchas gracias.*

## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
<b>3. MATERIAL Y MÉTODO .....</b>	<b>6</b>
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	6
3.2 MEDICIONES DE INTERCAMBIO GASEOSO.....	7
3.3 CÁLCULO DE LA CONDUCTANCIA DEL MESÓFILO .....	8
3.4 LIMITACIONES ESTOMÁTICAS Y DEL MESÓFILO A LA FOTOSÍNTESIS .....	9
3.5 CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y SUPERFICIE DE ÁREA FOLIAR.....	9
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	10
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>11</b>
4.1 PARÁMETROS QUE EXPLICAN LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA .....	11
4.2 LIMITACIONES DADAS POR LA CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA Y DEL MESÓFILO A LA FOTOSÍNTESIS.....	13
4.3 PARÁMETROS QUE EXPLICAN LA LIMITACIÓN BIOQUÍMICA DE LA FOTOSÍNTESIS .....	15
4.4 RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO FOLIAR Y PARÁMETROS CALCULADOS .....	17
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>20</b>
5.1 FACTORES QUE LIMITAN LA ASIMILACIÓN DEL CO <sub>2</sub> .....	20
5.1.1 Limitaciones dadas por la conductancia estomática y del mesófilo ...	21
5.1.2 Limitaciones bioquímicas a la actividad fotosintética .....	23
5.2 COMPARACIÓN DE PARÁMETROS ENTRE LAS ESPECIES.....	24
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>26</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>27</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Muestra de las plántulas seleccionadas, de izquierda a derecha: Peumo, Litre y Quillay.....	6
<b>Figura 2.</b> Cámara de intercambio gaseoso del equipo de fotosíntesis CIRAS – 2 (PP System, USA).....	7
<b>Figura 3.</b> Relación entre la tasa máxima de transporte de electrones que determina la regeneración de RuBP, $J_{max}$ , y la tasa máxima de carboxilación de la Rubisco, $V_{cmax}$ , calculada en función de la concentración de $CO_2$ en los espacios intercelulares, $C_i$ .....	13
<b>Figura 4.</b> Respuesta de la conductancia del mesófilo, $g_m$ , a la tasa de máxima fotosíntesis obtenida bajo condiciones de máxima luminosidad, con una temperatura del aire de $25^\circ C$ y a una concentración de $CO_2$ externa de 400 ppm, $A_{sat400aci}$ , obtenido desde las curvas $A/C_i$ . .....	14
<b>Figura 5.</b> Relación entre la tasa máxima de transporte de electrones que dirige la regeneración de RuBP, $J_{max}$ , y la tasa máxima de carboxilación de la Rubisco, $V_{cmax}$ , calculada en función de la concentración en los cloroplastos, $C_c$ . .....	15
<b>Figura 6.</b> Relación entre la tasa máxima de transporte de electrones que dirige la regeneración de RuBP, $J_{max}$ , y la tasa máxima de carboxilación de la Rubisco, $V_{cmax}$ , calculada en función de la concentración de $CO_2$ en los cloroplastos, $C_c$ (línea punteada), y en los espacios intercelulares, $C_i$ (línea sólida).. .....	16
<b>Figura 7.</b> Comparación entre $V_{cmax}$ , $J_{max}$ y la concentración de nitrógeno por unidad de área foliar. a) Tasa máxima de carboxilación de Rubisco ( $V_{cmax}$ ) calculada sobre la base de $C_i$ , explicada por la concentración de Nitrógeno por unidad de área foliar ( $N_a$ ). .....	18

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Parámetros fotosintéticos de las hojas para Peumo, Litre y Quillay. ....	12
<b>Cuadro 2.</b> Comparación entre Litre, Peumo y Quillay de los parámetros fotosintéticos que influyen en la difusión del $CO_2$ . .....	17

## RESUMEN

Las condiciones ambientales de crecimiento para las especies del bosque esclerófilo están sujetas a amplias variaciones durante el año, con marcada estacionalidad en relación al monto de las precipitaciones, concentradas en los meses de invierno, y las altas temperaturas y radiación solar y baja disponibilidad de agua, durante el período estival.

Este estudio compara cómo ciertas especies de estos ecosistemas se enfrentan a estas condiciones a través de la estimación de parámetros fotosintéticos que determinan las limitaciones, respecto a la difusión del CO<sub>2</sub> y la actividad bioquímica, a la fotosíntesis en Litre (*Lithraea caustica* (Molina) Hook. et Arn.), Quillay (*Quillaja saponaria* Molina) y Peumo (*Cryptocarya alba* (Molina) Looser), mediante el uso del modelo general de asimilación de CO<sub>2</sub> establecido por Farquhar *et al.* (1980).

La conductancia estomática ( $g_s$ ), la eficiencia en el uso del agua (EUA,  $E$ ) y de la luz ( $\alpha$ ) son similares para las especies estudiadas visto como una respuesta adaptativa a este tipo de ambientes cuyos parámetros se relacionan a los factores ambientales que determinan las características de estos ecosistemas.

Por otra parte, los parámetros bioquímicos, principalmente  $J_{max}$  y  $V_{cmax}$ , determinan las diferencias entre las especies y establecen las mayores limitaciones a la fotosíntesis, en comparación a las limitaciones de difusión del CO<sub>2</sub>. Ambos parámetros se calcularon en base a las concentraciones relativas de CO<sub>2</sub> intercelular ( $C_i$ ) y en los cloroplastos ( $C_c$ ), donde las estimaciones en base a  $C_c$  aumentaron los valores de  $V_{cmax}$  con respecto a  $C_i$  en un 100%, 97% y 70% y de  $J_{max}$  en un 13%, 13% y 7%, para Quillay, Peumo y Litre respectivamente, quedando en evidencia la subestimación de los valores de  $J_{max}$  y  $V_{cmax}$  cuando éstos son estimados en base a  $C_i$ .

La conductancia del mesófilo ( $g_m$ ), en términos absolutos fue mayor en Quillay que en Peumo o Litre. Sin embargo, en términos relativos ( $g_m/g_s$ ) no existieron diferencias entre las especies. Además, la razón  $g_m/g_s$  fue de  $0,47 \pm 0,08$ , lo que indicaría que estas especies esclerófilas poseen una conductancia del mesófilo proporcionalmente menor a las de otras latifoliadas ( $\sim 1$ ), lo que permitiría a estas especies reducir las tasas de fotosíntesis y consumo de agua, adecuándose de mejor manera a ambientes semiáridos.

Finalmente se concluye que Quillay es la especie que presenta las mayores tasas fotosintéticas ( $A_{sat}$ ), mayor conductancia del mesófilo ( $g_m$ ), mayor actividad bioquímica ( $J_{max}$ ,  $V_{cmax}$ ) y mayor eficiencia en el uso de nitrógeno ( $E_n$ ). Peumo presenta una respuesta similar a Quillay. Sin embargo, Litre resultó ser la especie que presenta menor tasa fotosintética en estos ambientes. En general estas especies presentan una mayor resistencia del mesófilo a la difusión del CO<sub>2</sub> lo que permite regular hacia abajo las tasas fotosintéticas reduciendo al mismo tiempo el consumo de agua.

### Palabras claves

Bosque esclerófilo, conductancia estomática, conductancia del mesófilo,  $J_{max}$ ,  $V_{cmax}$ , tasa fotosintética a saturación lumínica ( $A_{sat}$ ).

## ABSTRACT

The environmental conditions for growth of the sclerophyll forest species are subject to wide variations during the year, with marked seasonality in relation to the amount of rainfall, concentrated in the winter months, and high temperatures and solar radiation and low water availability during the summer period.

This study compares how certain species of these ecosystems are facing these conditions through the estimation of photosynthetic parameters that determine the limitations with respect to CO<sub>2</sub> diffusion and biochemical activity to the photosynthesis in Litre (*Lithraea caustica* (Molina) Hook. et Arn.), Quillay (*Quillaja saponaria* Molina) and Peumo (*Cryptocarya alba* (Molina) Looser), using the general model CO<sub>2</sub> assimilation developed by Farquhar et al. (1980).

Stomatal conductance ( $g_s$ ), water use efficiency (WUE,  $E$ ) and light use efficiency ( $\alpha$ ) were not significantly different among the studied species, which could be seen as an adaptive response to this type of environment whose parameters are related to environmental factors that determine the characteristics of these ecosystems.

Moreover, biochemical parameters, mainly  $J_{\max}$  and  $V_{\max}$ , determine the differences between species and establish the greatest limitations to photosynthesis, compared to CO<sub>2</sub> diffusion limitations. Both parameters were calculated based on the CO<sub>2</sub> concentrations in the intercellular airspaces ( $C_i$ ) and in the chloroplast ( $C_c$ ), where the estimations on a  $C_c$  basis increase the  $V_{\max}$  values about 100%, 97% y 37% and the  $J_{\max}$  values about 13%, 13% y 7%, for Quillay, Peumo and Litre respectively, providing evidence of the underestimation of the photosynthetic parameters when calculated on a  $C_i$  rather than  $C_c$  basis.

Mesophyll conductance ( $g_m$ ), in absolute terms was higher in Quillay than Peumo or Litre. However, in relative terms ( $g_m/g_s$ ) there were no differences between species. Furthermore, the ratio  $g_m/g_s$  was  $0.47 \pm 0.08$ , indicating that these sclerophyllous species exhibit a proportionally smaller mesophyll conductance than other hardwoods ( $\sim 1$ ), which would allow to these species to reduce the rates of photosynthesis and water use, adapting better to semi-arid environments.

Finally we conclude that Quillay is the species that grows faster in these ecosystems, exhibiting the highest photosynthetic rates ( $A_{\text{sat}}$ ), mesophyll conductance ( $g_m$ ), biochemical parameters ( $J_{\max}$ ,  $V_{\max}$ ), and nitrogen use efficiency ( $E_n$ ). Peumo exhibited a similar response to Quillay. However, Litre is the species with the smallest photosynthetic rate in these environments. All this sclerophyllous species exhibit greater mesophyll limitation down regulating the photosynthetic rate and water use.

### Keywords

Sclerophyll forest, stomatal conductance, mesophyll conductance,  $J_{\max}$ ,  $V_{\max}$ , photosynthetic rate ( $A_{\text{sat}}$ ).

## 1. INTRODUCCIÓN

El creciente aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), principalmente dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), producto de la acelerada actividad humana desarrollada desde el período preindustrial, ligada principalmente a la quema de combustibles fósiles y la deforestación, prevén importantes cambios a nivel global que impactan directamente la dinámica de los ecosistemas (IPCC, 2007). Uno de los principales efectos es el aumento de la temperatura del planeta. Se estima que durante los próximos 30 años, la temperatura se elevará en más de 3,5°C lo que representa una gran amenaza para las especies vegetales, estimándose que entre el 40 y 70% de éstas se encontrarían en peligro de extinción (IPCC, 2007). Además, y ligado al efecto de la temperatura, se prevé una disminución de las precipitaciones en las regiones mediterráneas del mundo afectando directamente a los ecosistemas de bosques mediterráneos, los que naturalmente ya se encuentran sometidos a restricciones hídricas durante el período estival. Esto provocaría una disminución en la disponibilidad de los recursos hídricos, lo que constituye una amenaza para estos ecosistemas (Gracia *et al.*, 2002).

La mitigación de los efectos del cambio climático está dada, en parte, por la funcionalidad de los ecosistemas forestales ya que, a escala global, los ecosistemas terrestres generan una retroalimentación positiva frente al principal impacto de este problema: la acumulación atmosférica de gases, entre ellos CO<sub>2</sub> (Heimann y Reichstein, 2008), permitiendo captar parte de las emisiones utilizadas en el proceso de transformación energética proporcionando de energía para la mantención y crecimiento de los mismos. Sin embargo es incierta la magnitud de esta retroalimentación por lo que es necesario generar modelos que permitan caracterizar esta relación y los procesos de asimilación de carbono, en cuanto a su captación, utilización y almacenamiento.

La participación de los ecosistemas forestales frente a los efectos del cambio climático depende principalmente de la capacidad de éstos para reducir el CO<sub>2</sub> presente en la atmósfera, lo que es llevado a cabo a través del proceso fotosintético, estimándose que el 10% del carbono total atmosférico es utilizado por este proceso cada año. Esto determina la importancia de su función debido al impacto sobre la atmósfera y clima terrestres, lo que hace que su conocimiento sea esencial para entender las relaciones entre las plantas y la atmósfera así como el balance de vida sobre la tierra (Pérez, 2009)

La fotosíntesis es un proceso de carácter físico-químico en donde las plantas, a través de la conversión de la energía lumínica a energía química, y la absorción de CO<sub>2</sub>, sintetizan compuestos orgánicos utilizados para la mantención de los tejidos propios de la planta y de las reservas de carbohidratos o para la formación de nuevos tejidos (Chapin *et al.*, 2002). El control sobre este proceso depende de la disponibilidad de los reactantes (energía lumínica y CO<sub>2</sub>), temperatura, que influye en las tasas de reacción, y la disponibilidad de nitrógeno, que determina la síntesis enzimática necesaria para llevar a cabo el proceso fotosintético. Estos factores determinan el área foliar de las plantas y el período o estación fotosintéticamente activa, lo que influye en la determinación de la producción primaria neta (= producción primera bruta – respiración autótrofa), lo que en definitiva establece diferencias en cada ecosistema. Es por esto que la asimilación de carbono en los ecosistemas depende de la respuesta de la conductancia estomática y del mesófilo y la

actividad bioquímica de la fotosíntesis a los distintos controladores ambientales (Chapin *et al.*, 2002).

En relación a como llevar a cabo la medición de estos procesos, existen diversos modelos que pueden ser aplicados para la evaluación de los flujos de carbono en los bosques. Sin embargo, los modelos de procesos parecen ser los de mayor flexibilidad, generalidad y eficacia (Landsberg, 2003), presentándose como herramientas esenciales para la identificación de procesos claves dentro de los ecosistemas, a cada nivel de organización, y la comprensión de efectos sobre el funcionamiento integrado del sistema (Zavala *et al.*, 2005). Estos modelos implican la modelación de un proceso de interés: fotosíntesis, distribución de carbono, respuestas estomáticas, entre otros, en donde es posible integrar sub-modelos constitutivos del proceso en cuestión, de tal manera que permitan evaluar el comportamiento y la respuesta del sistema (ecosistema) (Landsberg, 2003).

El ingreso de carbono, explicado por el proceso fotosintético, ha sido ampliamente estudiado bajo este enfoque, incluyendo descripciones bioquímicas del proceso de asimilación (Wullschleger, 1993).

Aún cuando existen diversos modelos de asimilación de carbono, el modelo bioquímico propuesto por Farquhar *et al.* (1980), luego mejorado por otros autores (von Caemmerer y Farquhar, 1981; Sharkey, 1985; Harley y Sharkey, 1991), es ampliamente usado para la descripción de la asimilación de CO<sub>2</sub> por las plantas de metabolismo C<sub>3</sub> (Bown *et al.*, 2007). Las principales aplicaciones de este modelo se encuentran en estudios de aclimatación de plantas a elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub> atmosféricos y temperatura, para calcular el balance de carbono en ecosistemas y para caracterizar factores que limitan la fotosíntesis en condiciones de estrés hídrico en bosques mediterráneos, entre otros (Bown *et al.*, 2007).

El modelo de Farquhar *et al.* (1980) es usado en el análisis de mediciones fotosintéticas realizadas a nivel de hojas individuales y en modelos de intercambio de carbono en escalas que van desde las hojas hasta las copas arbóreas (Bown *et al.*, 2007). En el modelo de hojas individuales la fotosíntesis es limitada por la tasa máxima de carboxilación de ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) carboxilasa-oxigenasa (Rubisco),  $V_{\text{cmax}}$ , que explica la tasa a la cual el dióxido de carbono es reducido una vez que llega a los sitios de carboxilación en los cloroplastos y es unida a una molécula aceptora (RuBP) gracias a la función catalizadora de la enzima Rubisco. Además de estar limitado por  $V_{\text{cmax}}$ , el modelo considera la limitación impuesta por la tasa máxima de transporte de electrones,  $J_{\text{max}}$ , como impulsor de la regeneración de RuBP (Farquhar *et al.*, 1980; von Caemmerer y Farquhar, 1981; von Caemmerer, 2000). Estos parámetros se ajustan en función de la respuesta de la fotosíntesis ( $A$ ) frente a la concentración del CO<sub>2</sub> en los espacios intercelulares ( $C_i$ ), lo que se conoce como curvas  $A/C_i$ , considerando que la difusión del CO<sub>2</sub> desde el exterior hacia estos espacios intercelulares implica cierta resistencia dada por los estomas, cuya magnitud es expresada como conductancia estomática del CO<sub>2</sub>,  $g_s$  (Bown *et al.*, 2007).

En muchos estudios de aplicación de modelos ecofisiológicos se ha considerado que la capacidad de la hoja para transferir el CO<sub>2</sub> desde los espacios intercelulares ( $C_i$ ) hacia los sitios de carboxilación ( $C_c$ ), es decir, la conductancia dada por el mesófilo ( $g_m$ ), es suficientemente grande como para que pueda ser omitida (Farquhar *et al.*, 1980). A pesar

de esto, existe creciente evidencia que señala que la limitación impuesta por  $g_m$  a la fotosíntesis puede ser similar a la impuesta por  $g_s$  (Harley *et al.*, 1992; Loreto *et al.*, 1992; von Caemmerer, 2000; Warren *et al.*, 2003; Warren y Adams, 2006; Flexas *et al.*, 2008, citado por Bown *et al.*, 2009), lo que se traduce en la existencia de un gradiente de concentración de  $\text{CO}_2$  desde el exterior de la hoja hacia los sitios de carboxilación ( $C_a < C_i < C_c$ ). Como resultado de este gradiente las estimaciones de  $V_{\text{cmax}}$  y  $J_{\text{max}}$  son subestimadas al ajustar el modelo en base a  $C_i$  en vez de  $C_c$ .

Aún cuando existe una extensa literatura destinada a comparar los valores de  $g_m$  entre especies y grupos funcionales (Loreto *et al.*, 1992) es muy poco lo que se conoce sobre las limitaciones bioquímicas y de la conductancia estomática y del mesófilo en especies vegetales de zonas áridas. Entre estos pocos estudios destaca Grassi y Magnani (2005) quienes estudiaron cómo las limitaciones relacionadas a la difusión del  $\text{CO}_2$ , estomática y no-estomáticas, y limitaciones bioquímicas en la fotosíntesis son afectadas por la sequía y morfogénesis foliar en bosques de roble y fresno en España. La finalidad de estos estudios fue comprender cómo las limitaciones impuestas al presupuesto de carbono son relevantes para evaluar la sostenibilidad del ecosistema y estimar con precisión la magnitud de carbono que es absorbido por las especies vegetales y en cómo estos valores se utilizan para la modelación a escala de la fotosíntesis desde la escala de hojas hasta la escala del dosel.

La importancia del presente estudio radica principalmente en dos aspectos. En primer lugar, la evidencia de que los cambios globales producidos por el aumento en la concentración de los gases de efecto invernadero, principalmente  $\text{CO}_2$ , y sus efectos en los ecosistemas terrestres, junto con el descenso de las precipitaciones entre las latitudes centrales del planeta, afectan directamente a los bosques mediterráneos ubicados en los diferentes zonas de Australia, Sudáfrica, Chile, California y la cuenca Mediterránea (Gracia *et al.*, 2002). En segundo lugar, la relevancia de los ecosistemas esclerófilos, los que constituyen la vegetación dominante en Chile Central, y su estado actual de degradación producto de las actividades humanas ejercidas a través de los años. Estos ecosistemas se caracterizan por presentar diversos tipos de estreses, los cuales limitan el desarrollo y reproducción de las plantas, debido a las marcadas variaciones estacionales durante el año (Cabrera, 2002), lo que sumado al posible efecto de reducción de precipitaciones y consecuente disponibilidad de los recursos hídricos, hacen a estos ecosistemas aún más vulnerables a su total degradación. Debido a esto, surge la necesidad de conocer cuáles son las restricciones que se generan frente a variaciones de los factores ambientales y que influyen en la capacidad fotosintética de las plantas, específicamente en ecosistemas esclerófilos, medidos por la tasa fotosintética ( $A$ ), y que afectan al proceso en términos físicos y químicos.

El propósito de este estudio fue determinar las limitaciones estomáticas, del mesófilo y bioquímicas a la fotosíntesis en tres especies comunes del ecosistema esclerófilo en Chile Central, *Quillaja saponaria* Molina, *Cryptocarya alba* (Molina) Looser y *Lithraea caustica* (Molina) Hook. *et Arn.*

Específicamente, se evaluó si los bajos valores de  $g_s$ ,  $g_m$  y de los parámetros bioquímicos,  $V_{\text{cmax}}$  y  $J_{\text{max}}$ , podían explicar una alta supervivencia y el lento crecimiento de estas especies en ambientes extremos. Además, se evaluó si la subestimación proporcional de estos

parámetros, en torno a la consideración de  $C_i$  y  $C_c$ , disminuían quizás de diferente manera para las distintas especies esclerófilas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Estimar y comparar limitaciones difusionales y bioquímicas a la fotosíntesis en tres especies del bosque esclerófilo: *Cryptocarya alba* (Molina) Looser (Peumo), *Quillaja saponaria* Molina (Quillay) y *Lithraea caustica* (Molina) Hook. et Arn. (Litre).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Estimar limitaciones difusionales a la fotosíntesis en las tres especies estudiadas.
- b. Estimar limitaciones bioquímicas a la fotosíntesis en las tres especies estudiadas.
- c. Comparar parámetros fotosintéticos entre las tres especies estudiadas

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

El material utilizado para llevar a cabo la investigación consistió en una muestra de 45 plantas seleccionadas al azar desde el Vivero Antumapu, de las especies Quillay (15), Litre (15) y Peumo (15), de 2 años de edad. Las semillas de Quillay y Litre fueron sembradas en almácigos para su germinación (Invierno 2008), siendo las plántulas repicadas a bolsas plásticas de 12×15, con 250 gramos de sustrato, principalmente de tierra y arena. Una vez pasada la primera temporada (2009) las plantas se cambiaron a bolsas de mayor volumen de 20×30 con 2 kg de sustrato. En el caso del peumo la siembra fue directa en bolsas de 12×15, para luego ser cambiadas a bolsas con mayor volumen. Las plantas se desarrollaron bajo condiciones ambientales con sombreado al 75%, con riego ocasional durante invierno y riego diario en verano.



**Figura 1.** Muestra de las plántulas seleccionadas, de izquierda a derecha: Peumo, Litre y Quillay.

Las plantas seleccionadas de Peumo, Quillay y Litre mostraron una altura promedio ( $\pm 1$  desviación estándar) de 63,4 ( $\pm 18,9$ ) cm, 82,93 ( $\pm 14,4$ ) cm y 47,61 ( $\pm 15,3$ ) cm; y un diámetro a la altura de cuello (DAC) de 9,13 ( $\pm 1,42$ ) mm, 7,53 ( $\pm 0,8$ ) mm, y de 11,03 ( $\pm 2,6$ ) mm, respectivamente.

Las mediciones de intercambio gaseoso se llevaron a cabo entre el 20 de diciembre del 2010 y el 15 de marzo del 2011 en un laboratorio sombreado con ventanas abiertas y sin grandes oscilaciones de temperatura ubicada en la Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza de la Universidad de Chile. Las mediciones se realizaron normalmente entre las 10:00 y las 18:00 horas.

### 3.2 MEDICIONES DE INTERCAMBIO GASEOSO

En forma simultánea se llevaron a cabo mediciones de intercambio gaseoso y fluorescencia de la clorofila en una hoja de cada una de las plantas escogidas (45 plantas, 45 hojas). El criterio de selección de cada muestra foliar consideró el último año de crecimiento, en el tercio superior de la planta, y un tamaño de la hoja superior a  $2,5 \text{ cm}^2$  de manera que la cámara de intercambio gaseoso (18 mm de diámetro, Figura 2) cubriera una sección completa de la hoja.

Cada planta fue trasladada desde el vivero al laboratorio durante el mismo día de medición, en donde el proceso fue controlado y medido a través de un sistema portátil de medición de fotosíntesis (CIRAS-2, PP System, MA, EEUU) integrado con una cámara de medición del intercambio gaseoso y fluorescencia de clorofila (PLC6 (U) Auto Leaf Cuvette, PP System, MA, EEUU).



**Figura 2.** Cámara de intercambio gaseoso del equipo de fotosíntesis CIRAS – 2 (PP System, USA).

Una vez dispuesta la muestra en la cámara, se reguló la temperatura a  $25^\circ\text{C}$ , mientras que el déficit de presión de vapor se mantuvo bajo 1 kPa. Transcurridos 10 minutos, en donde el intercambio gaseoso se equilibró a una concentración de 400 ppm de  $\text{CO}_2$  y a una radiancia de  $2000 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , se gatillaron curvas de fotosíntesis ( $A$ ) a diferentes niveles de radiancia ( $Q$ ), curvas  $A/Q$ , en la siguiente secuencia  $Q$ : 0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 y  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , manteniendo la concentración de carbono en la cámara ( $C_a$ ) a 400 ppm. Estas mediciones se registraron en la memoria interna de la máquina una vez que los valores de  $A$ ,  $C_i$  y  $g_s$  fueron estables, con un tiempo mínimo de espera de 3 minutos por punto, alcanzado un tiempo total de medición de alrededor de 90 minutos por curva.

A las curvas  $A/Q$  generadas se les ajustó el modelo de Prioul y Chartier (1977) que permite calcular la eficiencia cuántica aparente ( $\alpha$ ), convexidad de la curva ( $\theta$ ), la tasa de saturación lumínica de la fotosíntesis a una concentración ambiente de  $\text{CO}_2$  ( $A_{\text{sat}}$ ), y la tasa de respiración en la oscuridad ( $R_d$ ).

Una vez terminadas las curvas  $A/Q$ , se iniciaron inmediatamente y sobre la misma hoja una curva de respuesta de la fotosíntesis a la concentración de carbono intercelular,  $C_i$ , curvas  $A/C_i$ , en donde la concentración externa de  $\text{CO}_2$ ,  $C_a$ , se suministró paso a paso dado un set de 15 puntos, en la serie: 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 y 1500 ppm, manteniendo una radiancia de saturación de  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (espectro visible entre los 400 y 700 nm). En cada punto de medición se obtuvo simultáneamente la medición de la fluorescencia de la clorofila adaptada a la luz, en donde los valores de  $F'$  y  $F_m'$  permiten calcular la eficiencia fotoquímica del fotosistema II,  $\theta_{\text{PSII}}$ . Estos datos se almacenaron en la memoria interna, con un tiempo mínimo de espera de 3 minutos por punto, alcanzando un tiempo total de medición de alrededor de 90 minutos.

Los datos obtenidos se ajustaron al modelo fotosintético descrito por Farquhar *et al.* (1980), en donde los datos obtenidos de la curva  $A/C_i$  se ajustaron mediante una regresión no lineal de mínimos cuadrados. Los valores de  $V_{\text{cmax}}$ , tasa máxima de carboxilación de Rubisco, y  $R_d$ , se estimaron de la parte baja de la curva,  $C_i < 220 \mu\text{mol mol}^{-1}$ , los que luego se utilizaron para estimar  $J_{\text{max}}$  (tasa máxima de transporte de electrones), sobre el rango completo de valores de  $C_i$  de la curva. Las constantes de Michaelis – Menten para Rubisco en relación al  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ ,  $K_c$  y  $K_o$ , utilizadas en el ajuste (a  $25^\circ\text{C}$ ) fueron  $404,9 \mu\text{mol mol}^{-1}$  y  $278,4 \mu\text{mol mol}^{-1}$ , respectivamente (Bernacchi *et al.*, 2001).

Finalmente, los valores para el punto de compensación del  $\text{CO}_2$  en los cloroplastos,  $\Gamma^*$ , y la tasa de respiración mitocondrial en presencia de luz,  $R_d^*$ , se obtuvieron mediante el método de Laisk (von Cammerer, 2000). Brevemente, cada curva representa la respuesta de la fotosíntesis frente a seis diferentes concentraciones de carbono intercelular ( $C_i$ ): 25, 50, 75, 100, 200 y 400 ppm, sometidas a tres niveles de radiación  $Q$ : 50, 200 y  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , generando para cada curva un set de seis puntos según estos tres niveles. La relación entre  $A$  y  $C_i$  se ajusta por el método nombrado anteriormente, permitiendo calcular el punto de intersección de las tres rectas y así obtener los valores de  $R_d$  y  $\Gamma^*$ . El tiempo estimado de espera por punto es de 3 minutos, alcanzando un tiempo total de medición de alrededor de 120 minutos.

Cada uno de los ajustes de los datos a los modelos se realizó utilizando un software de análisis de gráficos y datos científicos (Sigma Plot, Versión 10.0, SPSS, Chicago, IL).

### 3.3 CÁLCULO DE LA CONDUCTANCIA DEL MESÓFILO

La conductancia del mesófilo,  $g_m$ , se estimó utilizando el método “ $J$  constante” (Harley *et al.*, 1992; Loreto *et al.*, 1992), donde  $J$  representa la tasa de transporte de electrones. Este método se basa en el uso de los datos de la región limitada por la regeneración de RuBP, obtenidos de las curvas  $A/C_i$ , en donde la tasa de transporte de electrones es constante. En esta región de la curva, el aumento de la actividad fotosintética con el incremento de  $C_i$  se explica por la supresión de la fotorrespiración, en la medida que la tasa de carboxilación aumenta progresivamente en relación a la tasa de oxigenación. De esta manera el proceso fotosintético se relaciona a la concentración de  $\text{CO}_2$  en los cloroplastos y a la especificidad de  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  de Rubisco, descrita por el punto de compensación de  $\text{CO}_2$ .

El método de  $J$  Constante es sensible a errores en la estimación de la tasa de respiración mitocondrial  $R_d^*$  y en el punto de compensación de  $\text{CO}_2$ , y asume que tanto la tasa de transporte de electrones  $J$ , como la conductancia del mesófilo  $g_m$ , son constantes a través del rango de concentración de  $\text{CO}_2$  externo ( $C_a$ ) utilizado en la medición del intercambio gaseoso (Harley *et al.*, 1992; Pons *et al.*, 2009).

La relación existente entre  $g_m$  y  $\Gamma^*$ , la respiración mitocondrial,  $R_d^*$ , y el punto de compensación intercelular en ausencia de respiración de día  $C_i^*$  está dado por la expresión:  $\Gamma^* = C_i^* + R_d^*/g_m$  (von Caemmerer, 2000).

La eficiencia fotoquímica del PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) se estima de las mediciones de fluorescencia de la clorofila como  $(F_m' - F)/F_m'$ , donde  $F$  es el valor estable y  $F_m'$  el valor máximo, de fluorescencia obtenidos de la muestra adaptada a la luz (Schreiber *et al.*, 1994). Los valores de  $\Phi_{\text{PSII}}$ , son directamente proporcionales a la tasa de transporte de electrones a través del PSII y por lo tanto pueden ser utilizados para determinar la porción de la curva  $A/C_i$  donde la tasa es constante (Genty *et al.*, 1989). Los valores óptimos para la conductancia del mesófilo  $g_m$ , se calculan mediante la iteración de tres o más mediciones de fotosíntesis a altos niveles de  $C_i$  asociados a una tasa constante de transporte de electrones (Singsaas *et al.*, 2003; Warren, 2006). Esto fue realizado utilizando la herramienta Solver en Microsoft Excel con los datos registrados de  $A$ ,  $C_i$ ,  $\Gamma^*$ ,  $R_d^*$  correspondientes a cada muestra, los que se utilizan para evaluar el valor de  $g_m$  que mejor explica los cambios de la fotosíntesis frente a cambios de  $C_i$ , dado por la mínima varianza en  $J$  (Harley *et al.*, 1992, Singsaas *et al.*, 2003; Warren, 2006).

### 3.4 LIMITACIONES ESTOMÁTICAS Y DEL MESÓFILO A LA FOTOSÍNTESIS

Los valores obtenidos de la curva  $A/C_i$  y los valores para  $g_m$  y  $g_s$  se utilizan para dividir las limitaciones bioquímicas, del mesófilo y estomáticas a la fotosíntesis. Los valores de la conductancia estomática a la transferencia del  $\text{CO}_2$ , se calculan por medio de la división de la transferencia del vapor de agua por 1,64, de acuerdo a la diferencia en las tasas de difusión del vapor de agua y el  $\text{CO}_2$  en el aire (Jones, 1992). La limitación estomática se calcula a través del método de Farquhar y Sharkey (1982) como  $L_s = 1 - (A_a - g_s/A_i - g_s)$ , en donde  $A_a - g_s$  y  $A_i - g_s$ , representan el valor actual y estimado de  $A$ , respectivamente, cuando  $g_s$  tiende a infinito. En cuanto a la limitación del mesófilo, ésta se calcula mediante el método de Bernacchi *et al.* (2002) de acuerdo a la expresión  $L_m = 1 - (A_a - g_m/A_i - g_m)$ , donde  $A_a - g_m$  y  $A_i - g_m$  representan el valor actual y estimado de  $A$ , respectivamente, cuando  $g_m$  tiende a infinito. La concentración de  $\text{CO}_2$  en los cloroplastos,  $C_c$ , se deduce según la ley de Fick como  $C_c = C_i - A/g_m$ .

### 3.5 CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y SUPERFICIE DE ÁREA FOLIAR

Una vez realizadas las mediciones de intercambio gaseoso las muestras se almacenaron en sobres de papel delimitando el perímetro de la hoja y fueron secadas a  $70^\circ\text{C}$  hasta lograr peso constante. Luego del proceso de secado las muestras se enviaron al Laboratorio de Análisis de Suelo y Foliar de la Universidad Católica de Chile, donde se determinó el contenido de nitrógeno total mediante el método de Dumas, el cual consiste en llevar a cabo

una combustión total de la muestra a altas temperaturas (950°C) para posteriormente detectar el elemento a través de termconductividad (LECO, TruSpec CN, EEUU).

Para medir la superficie foliar de la muestra se utilizó un software (ImageJ) de medición de área foliar conectado a un scanner, cuyos valores fueron ratificados a través de la aplicación de una grilla de puntos sobre cada hoja. Una vez obtenidas las superficies se calculó el área foliar específica AFE, representada por el cuociente entre la superficie de la hoja en una cara ( $\text{cm}^2$ ) y el peso seco (g) de la misma.

Las concentraciones de nitrógeno fueron expresadas sobre la base de área foliar de una cara de la hoja,  $N_a$ , mientras que la eficiencia en el uso de nitrógeno  $E_n$ , se expresa como  $A/N_a$ .

### **3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis de datos se realizó utilizando el software R Project (R Development Core Team, 2010). Los parámetros de conductancia estomática y del mesófilo ( $g_s$ ,  $g_m$ ) y bioquímicos ( $V_{\text{cmax}}$ ,  $J_{\text{max}}$ ) a la fotosíntesis, se evaluaron mediante análisis de varianza de un factor (especies), aplicando la prueba de Tukey para evaluar diferencias significativas entre las especies, en casos en donde existan, utilizando un nivel de confianza de  $P < 0,05$ . Las diferencias entre interceptos y pendientes de las relaciones lineales de los parámetros bioquímicos y de difusión ( $g_s$ ,  $g_m$ ) con el contenido de nitrógeno foliar se evaluaron a través de análisis de covarianza.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 PARÁMETROS QUE EXPLICAN LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA

Las tasas de fotosíntesis, obtenidas desde las curvas  $A/Q$  y  $A/C_i$ , calculadas a máxima irradiación ( $2000 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) y a una concentración ambiente de  $\text{CO}_2$  (400 ppm), resultaron ser significativamente mayores en Quillay ( $14,2 \pm 0,8 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) comparadas con Peumo ( $9,5 \pm 0,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y Litre ( $7,8 \pm 0,7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) ( $F_{2,41} = 24,61$ ,  $P < 0,001$ ) (Cuadro 1). Por otro lado la eficiencia cuántica aparente ( $\alpha$ ) no fue significativamente diferente entre las especies ( $0,03 \pm 0,007 \text{ mol CO}_2 \text{ mol quanta}^{-1}$ ).

La tasa máxima de carboxilación de Rubisco ( $V_{\text{cmax}}$ ) calculada sobre la base de  $C_i$  presenta los mayores valores en Quillay ( $49 \pm 2,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), luego Peumo ( $32,6 \pm 1,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y finalmente Litre ( $26,8 \pm 2,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), con diferencias significativas entre Quillay y las otras especies ( $F_{2,41} = 32,2$ ,  $P < 0,001$ ). Lo mismo se observa en relación a la tasa de transporte de electrones,  $J_{\text{max}}$ , calculada sobre la base de  $C_i$  en donde Quillay ( $111,4 \pm 5,6 \mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) presenta diferencias en comparación a Peumo ( $79,6 \pm 3,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y Litre ( $56,3 \pm 4,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) ( $F_{2,41} = 37,4$ ,  $P < 0,001$ ) (Cuadro 1). La relación entre ambos parámetros, es altamente significativa ajustándose a una función lineal dada por  $J_{\text{max}} = 5,63 + 2,12V_{\text{cmax}}$ ,  $r^2 = 0,87$ ,  $P < 0,001$  (Figura 3). Además, no se observaron diferencias significativas en los valores dados por la razón entre  $J_{\text{max}}$  y  $V_{\text{cmax}}$ , presentando un valor medio de  $2,29 \pm 0,05$  para todas las especies.

En cuanto al área foliar específica ( $AFE$ ) y la concentración de nitrógeno sobre la base de una cara ( $N_a$ ), ambos parámetros presentan diferencias significativas entre especies ( $F_{2,41}=8,3$ ,  $P < 0,001$  para  $AFE$ ;  $F_{2,41}=5,32$ ,  $P < 0,01$  para  $N_a$ ). En ambos casos se observa que el mayor valor medio obtenido corresponde a Peumo, seguido por Quillay y finalmente Litre, en donde las diferencias obtenidas son significativas solo entre Litre y Peumo (Cuadro 1). En cuanto a la eficiencia en el uso de nitrógeno ( $E_n$ ), los mayores valores se presentan en Quillay, Litre y finalmente Peumo, encontrando diferencias significativas solo entre Peumo y Quillay ( $F_{2,41}=5,96$ ,  $P < 0,01$ ) (Cuadro 1).

La tasa de evapotranspiración ( $E$ ) no presenta diferencias entre las especies presentando un valor medio de  $2831 \pm 309 \mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Con respecto a la eficiencia en el uso de agua (UEA), explicado como moles de agua que se liberan a la atmósfera por cada mol de  $\text{CO}_2$  incorporado a la planta, tampoco se observan diferencias entre especies, presentando un valor medio de  $337 \pm 41 \text{ mol H}_2\text{O mol}^{-1} \text{ CO}_2$ .

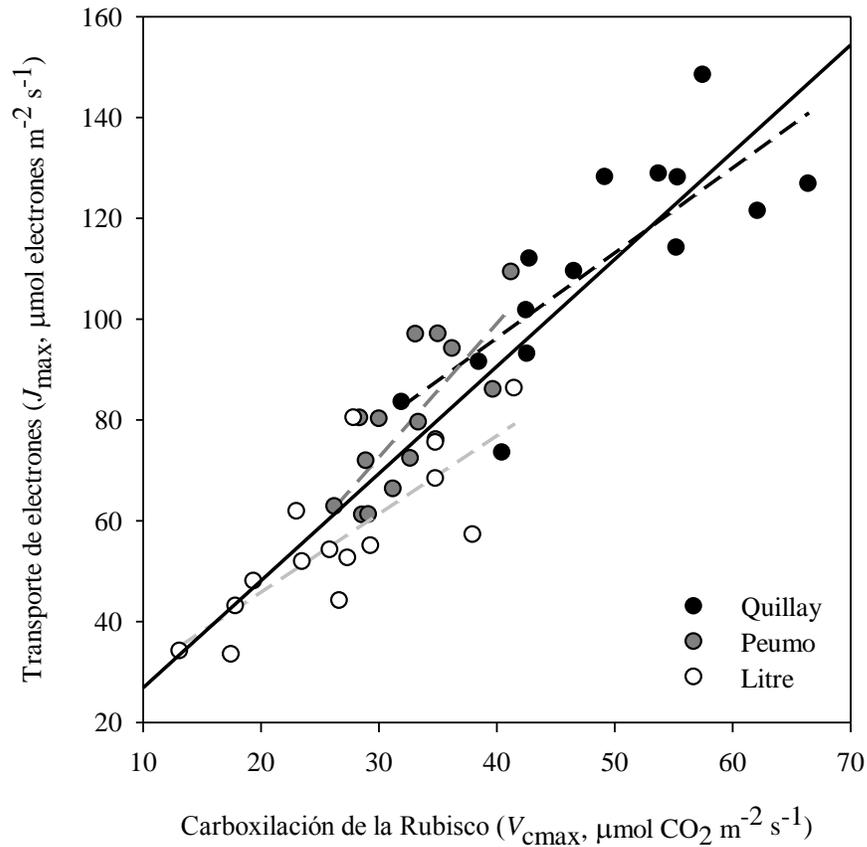
La tasa de respiración mitocondrial  $R_{d,(AQ)}$  no presenta diferencias significativas entre las especies, obteniendo un valor medio de  $0,77 \pm 0,10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . En relación a los valores obtenidos para la tasa de respiración mitocondrial calculados en base a las curvas  $A/C_i$ ,  $R_{d,(ACi)}$ , se observan diferencias significativas entre las especies ( $F_{2,41}=5,9$ ,  $P < 0,01$ ), en donde los mayores valores son dados por Quillay luego Peumo y finalmente Litre, encontrándose diferencias significativas entre Quillay y Litre (Cuadro 1).

Por otra parte, la tasa de respiración mitocondrial en presencia de luz,  $R_d^*$ , fue significativamente menor en Litre que en Quillay y Peumo ( $F_{2,41}=9,88$ ,  $P < 0,001$ ) (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Parámetros fotosintéticos de las hojas para Peumo, Litre y Quillay.

Variable	Unidad	Especies Esclerófilas			ANOVA
		Litre	Peumo	Quillay	
$AFE$	( $m^2 kg^{-1}$ )	$7 \pm 0,4$ a	$10 \pm 0,7$ b	$8,7 \pm 0,5$ ab	***
$N_a$	( $mmol m^{-2}$ )	$120,2 \pm 8,9$ a	$195,5 \pm 21$ b	$165,8 \pm 17,6$ ab	**
$A_{sat}$	( $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ )	$7,8 \pm 0,7$ a	$9,5 \pm 0,4$ a	$14,2 \pm 0,8$ b	***
$\alpha$	( $mol mol^{-1}$ )	$0,033 \pm 0,009$	$0,042 \pm 0,019$	$0,023 \pm 0,002$	ns
$E_n$	( $\mu mol mol^{-1} s^{-1}$ )	$69,8 \pm 9,1$ ab	$56,4 \pm 6,2$ a	$95,9 \pm 8,8$ b	**
$E$	( $\mu mol H_2O m^{-2} s^{-1}$ )	$2133 \pm 447$	$2913 \pm 476$	$3492 \pm 654$	ns
$1 / UEA$	( $mol H_2O mol^{-1} CO_2$ )	$376 \pm 93$	$347 \pm 57$	$285 \pm 60$	ns
$A_{sat 400ACi}$	( $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ )	$6,7 \pm 0,5$ a	$8,3 \pm 0,3$ a	$13,2 \pm 0,7$ b	***
$V_{cmax,Ci}$	( $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ )	$26,8 \pm 2,1$ a	$32,6 \pm 1,1$ a	$49 \pm 2,6$ b	***
$J_{max,Ci}$	( $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ )	$56,3 \pm 4,1$ a	$79,6 \pm 3,8$ a	$111,4 \pm 5,6$ b	***
$J_{max} / V_{cmax,Ci}$	-	$2,15 \pm 0,1$	$2,44 \pm 0,07$	$2,29 \pm 0,07$	ns
$R_{d,(AQ)}$	( $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ )	$0,7 \pm 0,1$	$1 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1$	ns
$R_{d,(ACi)}$	( $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ )	$0,8 \pm 0,1$ a	$1,3 \pm 0,1$ ab	$1,4 \pm 0,2$ b	**
$R_d^*$	( $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ )	$-1 \pm 0,1$ a	$-1,7 \pm 0,2$ b	$-1,5 \pm 0,1$ b	***

El cuadro 1 presenta los promedios como la media ( $\pm 1$  ES) para el área foliar específica ( $AFE$ ), concentración de nitrógeno foliar ( $N_a$ ), la tasa fotosintética bajo condiciones de saturación lumínica ( $A_{sat}$ ), la eficiencia cuántica aparente ( $\alpha$ ), la eficiencia en el uso de nitrógeno ( $E_N$ ), evapotranspiración ( $E$ ) y la eficiencia en el uso del agua ( $1/UEA$ ). A base de las curvas  $A/C_i$ , se determinó la tasa de fotosíntesis bajo condiciones de saturación lumínica ( $A_{sat 400ACi}$ ), la tasa máxima de carboxilación de Rubisco ( $V_{cmax}$ ), la tasa máxima de transporte de electrones que determina la regeneración de RuBP ( $J_{max}$ ), la proporción entre  $J_{max} / V_{cmax}$  calculado sobre la base de  $C_i$ . Finalmente, las tasas de respiración en luminosidad,  $R_{dAQ}$  y  $R_d$ , estimadas de las curvas  $A/Q$  y  $A/C_i$ , respectivamente y la tasa de respiración en la luz ( $R_d^*$ ) estimado desde las curvas Laisk. La separación de los valores medios fue determinada a través del test de Tukey cuando fuera aplicable. Las letras determinan la existencia de diferencias significativas entre los valores medios de las especies con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .



**Figura 3.** Relación entre la tasa máxima de transporte de electrones que determina la regeneración de RuBP,  $J_{\max}$ , y la tasa máxima de carboxilación de la Rubisco,  $V_{\text{cmax}}$ , calculada en función de la concentración de  $\text{CO}_2$  en los espacios intercelulares,  $C_i$ , dado por  $J_{\max} = 5,63 + 2,12V_{\text{cmax}}$ ,  $r^2 = 0,87$ ,  $P < 0,001$ . No se observan diferencias significativas en pendientes ( $F_{2,38}=1,05$ ,  $P=0,36$ ) pero sí en los interceptos ( $F_{2,38}=5,43$ ,  $P<0,01$ ) entre las especies. Líneas punteadas representan el ajuste lineal para cada una de las especies.

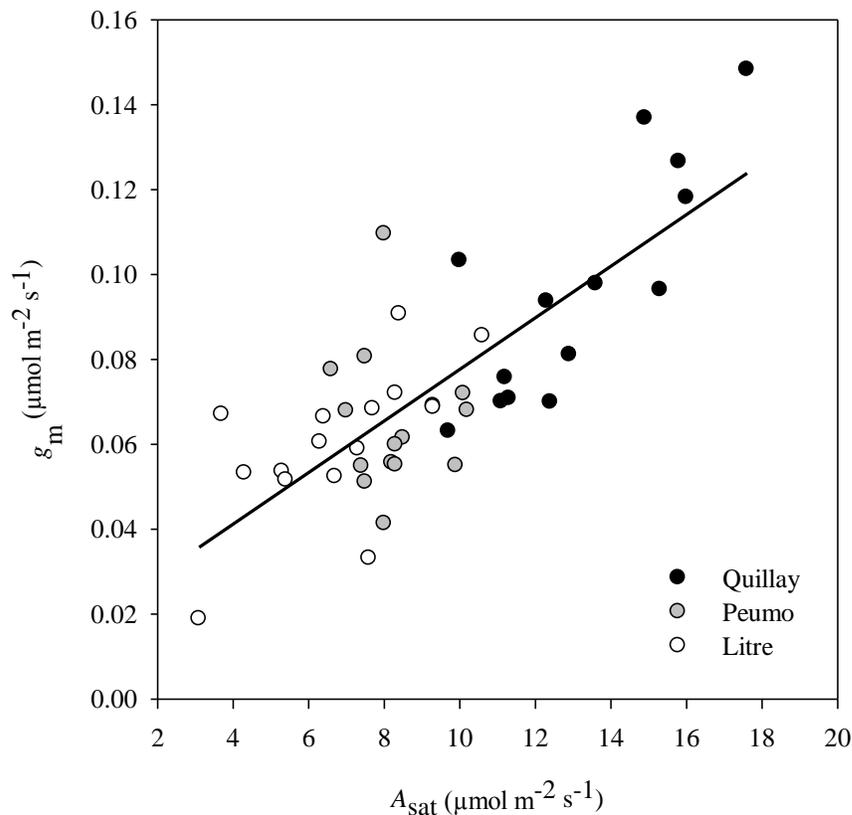
#### 4.2 LIMITACIONES DADAS POR LA CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA Y DEL MESÓFILO A LA FOTOSÍNTESIS

El punto de compensación del  $\text{CO}_2$  en los cloroplastos,  $\Gamma^*$ , no presenta diferencias entre especies alcanzando un valor medio de  $50,65 \pm 1,5 \mu\text{mol mol}^{-1}$ . El punto de compensación del  $\text{CO}_2$  en los espacios intercelulares en ausencia de luz,  $C_i^*$ , sí fue significativamente ( $F_{2,41} = 3,71$ ,  $P < 0,05$ ) menor en Peumo que en Quillay (Cuadro 2).

La conductancia del mesófilo ( $g_m$ ), presentó diferencias significativas ( $F_{2,41} = 12,82$ ,  $P < 0,001$ ) entre Quillay y las otras dos especies (Cuadro 2), mientras que la conductancia estomática ( $g_s$ ) no muestra diferencias, alcanzando un valor medio de  $0,23 \pm 0,01 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Similarmente, la proporción ( $g_s/g_m$ ) entre ambos parámetros mencionados no tiene diferencias significativas, alcanzando un valor medio de  $0,47 \pm 0,08$ .

No se encontró una correlación entre  $g_s$  y los parámetros fotosintéticos, pero si entre  $g_m$  y  $A_{sat}$ , dado por  $g_m = 0,017 + 0,006A_{sat}$ ,  $r^2 = 0,67$ ,  $P < 0,001$  (Figura 4). Esta relación fue independiente de las especies.

Las limitaciones estomáticas,  $L_s$ , y del mesófilo,  $L_m$ , a la fotosíntesis no fueron significativamente diferentes entre las especies esclerófilas. El valor medio  $L_m$  fue de  $0,4 \pm 0,02$ , y fue mayor que la impuesta por los estomas, alcanzando un valor medio de  $0,07 \pm 0,01$  para las tres especies.

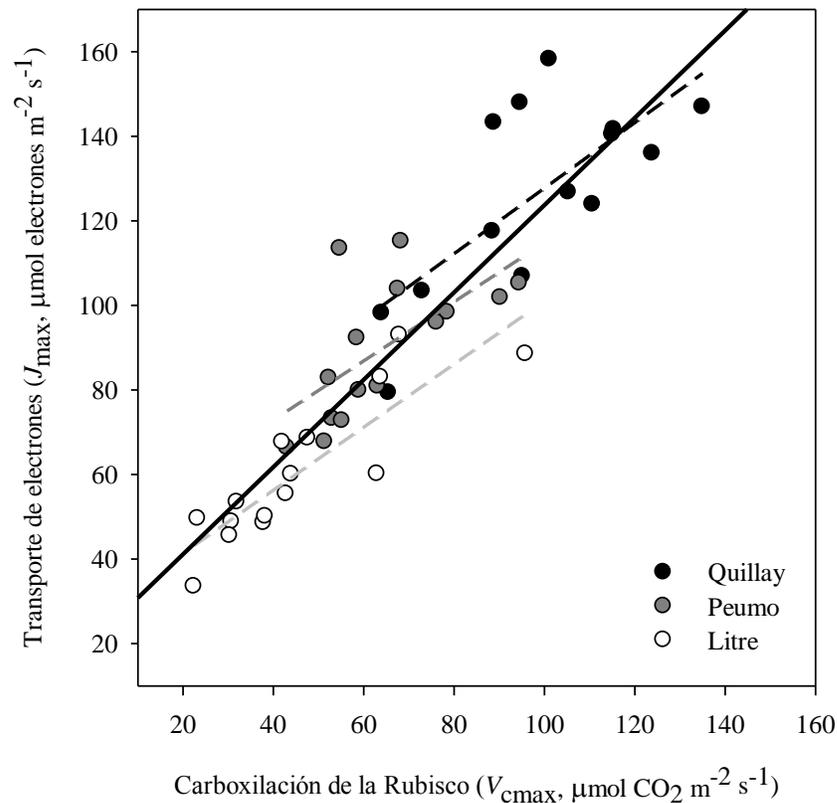


**Figura 4.** Respuesta de la conductancia del mesófilo,  $g_m$ , a la tasa de máxima fotosíntesis obtenida bajo condiciones de máxima luminosidad, con una temperatura del aire de 25°C y a una concentración de  $\text{CO}_2$  externa de 400 ppm,  $A_{sat400aci}$ , obtenido desde las curvas  $A/C_i$ . La relación entre ambos parámetros fue altamente significativa ( $g_m = 0,017 + 0,006A_{sat400aci}$ ,  $r^2 = 0,67$ ,  $P < 0,001$ ). El análisis de covarianza mostró que, tanto en pendientes ( $F_{2,38}=3,107$ ,  $P=0,056$ ) como interceptos ( $F_{2,38}=0,411$ ,  $P=0,666$ ), no hubo diferencias significativas entre las especies.

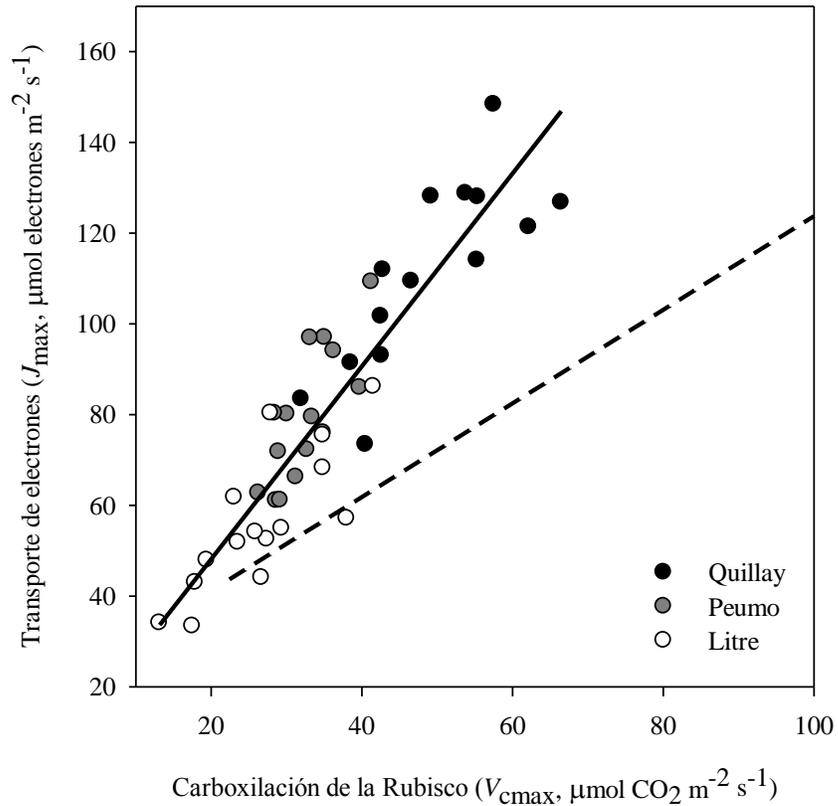
### 4.3 PARÁMETROS QUE EXPLICAN LA LIMITACIÓN BIOQUÍMICA DE LA FOTOSÍNTESIS

Los valores de  $V_{\text{cmax,cc}}$  presentaron diferencias significativas ( $F_{2,41} = 29,33$ ,  $P < 0,001$ ) entre Quillay y las otras dos especies, mientras que  $J_{\text{max,cc}}$  presentó grandes diferencias entre todas las especies ( $F_{2,41} = 44,95$ ,  $P < 0,001$ ) (Cuadro 2). Ambos parámetros calculados sobre la base de  $C_c$  muestran una correlación positiva dado por  $J_{\text{max}} = 21,99 + 1,01V_{\text{cmax}}$ ,  $r^2 = 0,86$ ,  $P < 0,001$  (Figura 5).

Los valores calculados para  $V_{\text{cmax}}$ ,  $J_{\text{max}}$  y  $R_d$  sobre la base de  $C_c$  fueron mayores que los calculados sobre la base de  $C_i$  (Figura 6). Los valores medios para  $V_{\text{cmax}}$ , y  $J_{\text{max}}$  calculados sobre la base de  $C_c$  fueron 100% y 13%, 97% y 13%, y 70% y 7% mayores que los calculados sobre  $C_i$  para Quillay, Peumo y Litre, respectivamente. Lo mismo sucede con las tasas de respiración considerando que estos valores aumentan con el cálculo en base a  $C_c$  en un 93%, 95% y 38% para Quillay, Peumo y Litre, respectivamente.



**Figura 5.** Relación entre la tasa máxima de transporte de electrones que dirige la regeneración de RuBP,  $J_{\text{max}}$ , y la tasa máxima de carboxilación de la Rubisco,  $V_{\text{cmax}}$ , calculada en función de la concentración en los cloroplastos,  $C_c$ , dado por  $J_{\text{max}} = 21,99 + 1,01V_{\text{cmax}}$ ,  $r^2 = 0,86$ ,  $P < 0,001$ . El análisis de covarianza no mostró diferencias significativas en pendientes ( $F_{2,38}=0,035$ ,  $P=0,97$ ) pero sí en los interceptos ( $F_{2,38}=6,96$ ,  $P < 0,01$ ), entre las especies. Líneas punteadas representan el ajuste lineal para cada una de las especies.



**Figura 6.** Relación entre la tasa máxima de transporte de electrones que dirige la regeneración de RuBP,  $J_{\max}$ , y la tasa máxima de carboxilación de la Rubisco,  $V_{\text{cmax}}$ , calculada en función de la concentración de  $\text{CO}_2$  en los cloroplastos,  $C_c$  (línea punteada), y en los espacios intercelulares,  $C_i$  (línea sólida). El ajuste dado sobre la base de  $C_c$  corresponde a  $J_{\max} = 21,99 + 1,01V_{\text{cmax}}$ ,  $r^2 = 0,86$ ,  $P < 0,001$ , y el dado para  $C_i$  es  $J_{\max} = 5,63 + 2,12V_{\text{cmax}}$ ,  $r^2 = 0,87$ ,  $P < 0,001$ , ambos altamente significativos. Los valores medios calculados para  $J_{\max}$  y  $V_{\text{cmax}}$  sobre la base de  $C_c$  fueron mayores a los calculados sobre la base de  $C_i$  (Cuadro 2). Las pendientes de los ajuste en base a  $C_c$  y  $C_i$  no mostraron diferencias significativas entre especies ( $F_{2,38}=0,035$ ,  $P=0,97$ ;  $F_{2,38}=1,05$ ,  $P=0,36$ ), encontrando diferencias en los interceptos de ambos ajustes ( $F_{2,38}=6,96$ ,  $P<0,01$ ;  $F_{2,38}=5,43$ ,  $P<0,01$ ).

La relación entre estos parámetros ( $J_{\max,cc}/V_{\text{cmax},cc}$ ) no observa diferencias significativas entre las especies presentando un valor medio de  $1,38 \pm 0,04$ . En cuanto a la tasa de respiración,  $R_{d,cc}$ , se observan diferencias significativas entre Litre y las otras dos especies ( $F_{2,41} = 12,75$ ,  $P<0,001$ ) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Comparación entre Litre, Peumo y Quillay de los parámetros fotosintéticos que influyen en la difusión del CO<sub>2</sub>.

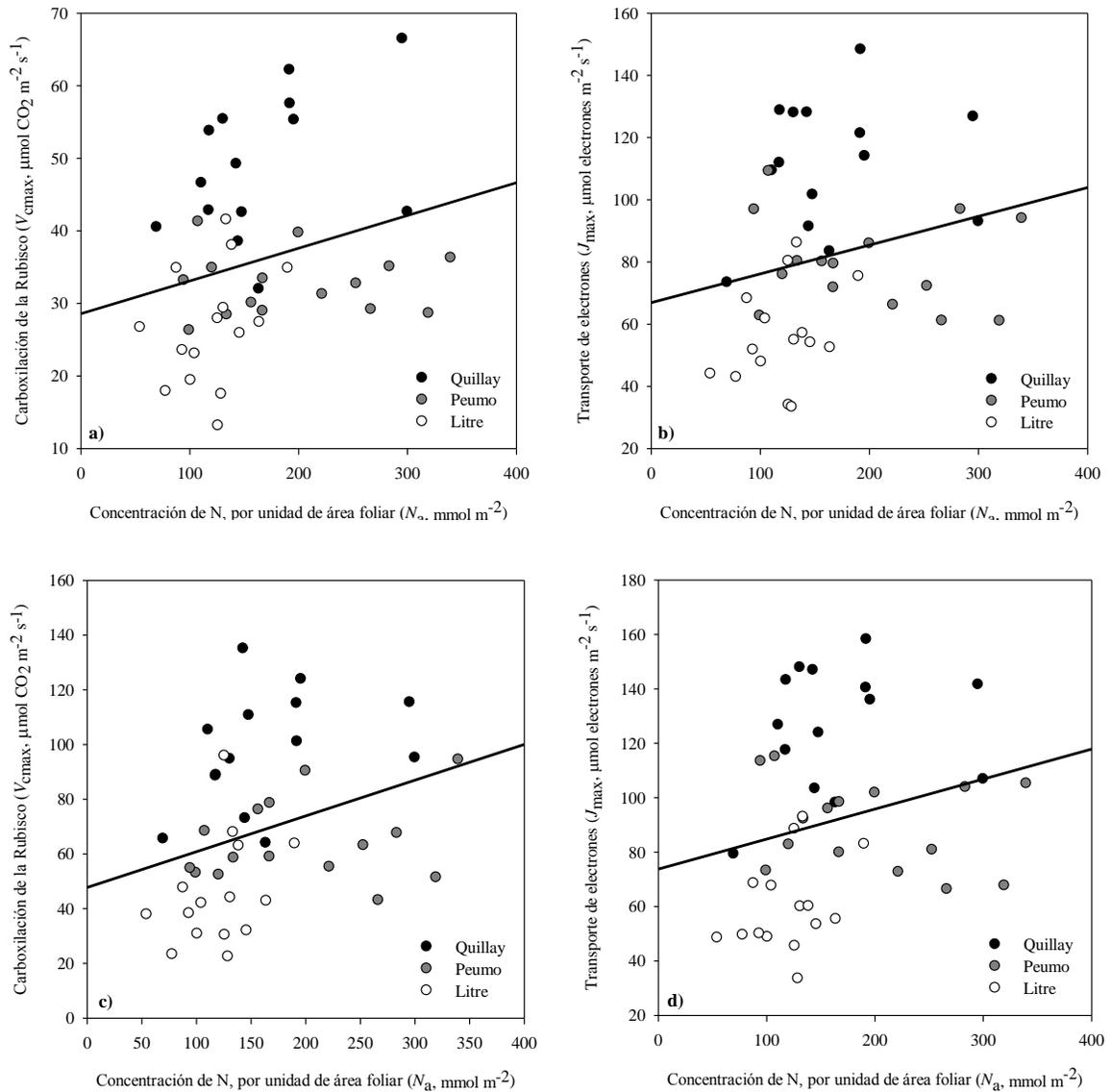
Variable	Unidad	Especies Esclerófilas			ANOVA
		Litre	Peumo	Quillay	
$C_i^*$	( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )	33 $\pm$ 4,2 ab	23,2 $\pm$ 2,3 a	34 $\pm$ 2,4 b	*
$\Gamma^*$	( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )	51,7 $\pm$ 3,4	49,2 $\pm$ 2	51,2 $\pm$ 2,2	ns
$C_a$	( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )	368,3 $\pm$ 0,6	366,1 $\pm$ 3,5	368,7 $\pm$ 0,6	ns
$C_i$	( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )	337,7 $\pm$ 7	336,5 $\pm$ 6,9	333,6 $\pm$ 3,7	ns
$C_c$	( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )	220 $\pm$ 10,3	202,5 $\pm$ 8,2	192,8 $\pm$ 5,9	ns
$g_m$	( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{bar}^{-1}$ )	0,06 $\pm$ 0,005 a	0,065 $\pm$ 0,004 a	0,097 $\pm$ 0,007 b	***
$g_s$	( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	0,221 $\pm$ 0,03	0,227 $\pm$ 0,023	0,25 $\pm$ 0,018	ns
$g_m/g_s$	-	0,54 $\pm$ 0,18	0,43 $\pm$ 0,14	0,43 $\pm$ 0,06	ns
$L_s$	(%)	0,07 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,01	ns
$L_m$	(%)	0,35 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,02	ns
$V_{\text{cmax},C_c}$	( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	45,5 $\pm$ 5,1 a	64,4 $\pm$ 3,8 a	98,3 $\pm$ 5,7 b	***
$J_{\text{max},C_c}$	( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	60,4 $\pm$ 4,4 a	89,9 $\pm$ 4,2 b	126,4 $\pm$ 6,1 c	***
$J_{\text{max}}/V_{\text{cmax},C_c}$	-	1,41 $\pm$ 0,07	1,43 $\pm$ 0,06	1,31 $\pm$ 0,05	ns
$R_{d,C_c}$	( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	1,1 $\pm$ 0,1 b	2,6 $\pm$ 0,3 a	2,7 $\pm$ 0,3 a	***

El cuadro 2 expone los resultados obtenidos para los parámetros fotosintéticos que influyen en la difusión del CO<sub>2</sub>, entre Litre, Peumo y Quillay, dados por los valores medios ( $\pm$  1 ES) en el punto de compensación de CO<sub>2</sub> intercelular ( $C_i^*$ ), y en los cloroplastos ( $\Gamma^*$ ) en ausencia de la respiración mitocondrial. La concentración externa ( $C_a$ ), intercelular ( $C_i$ ) y cloroplástica ( $C_c$ ) de CO<sub>2</sub>. La conductancia estomática ( $g_s$ ) y del mesófilo ( $g_m$ ) al CO<sub>2</sub> y la razón entre ambos ( $g_m/g_s$ ), las limitaciones relativas de los estomas,  $L_s$ , y del mesófilo,  $L_m$ , a la fotosíntesis. Finalmente se presentan los valores para  $J_{\text{max}}$ ,  $V_{\text{cmax}}$ ,  $J_{\text{max}}/V_{\text{cmax}}$  y  $R_d$  calculado sobre la base de la concentración de CO<sub>2</sub> en los cloroplastos ( $C_c$ ). La separación de las medias se determinó a través de un test de Tukey, cuando fuera aplicable. Las diferentes letras entre las especies indican si existen diferencias significativas entre los valores medios con  $P < 0,05$ .

#### 4.4 RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO FOLIAR Y PARÁMETROS CALCULADOS

Los valores de  $V_{\text{cmax}}$  (Figura 7 y 9) y  $J_{\text{max}}$  (Figura 8 y 10) están relacionadas con el contenido relativo de nitrógeno en las hojas ( $N_a$ ). Ambos parámetros calculados sobre la base de  $C_i$  y  $C_c$  se ajustan a una relación lineal con  $N_a$ , presentando diferencias significativas en los interceptos pero no pendientes, entre las distintas especies.

No se encontró relación entre  $g_s$  y  $g_m$  y el contenido de nitrógeno por unidad de área foliar.



**Figura 7.** Comparación entre  $V_{cmax}$ ,  $J_{max}$  y la concentración de nitrógeno por unidad de área foliar. **a)** Tasa máxima de carboxilación de Rubisco ( $V_{cmax}$ ) calculada sobre la base de  $C_i$ , explicada por la concentración de Nitrógeno por unidad de área foliar ( $N_a$ ). La relación entre ambos parámetros fue significativa, dado por el ajuste  $V_{cmax} = 28,58 + 0,045N_a$ ,  $r^2 = 0,65$ ,  $P < 0,01$ . Interceptos difieren significativamente entre las especies ( $F_{2,38} = 31,27$ ,  $P < 0,001$ ), no así las pendientes ( $F_{2,38} = 1,42$ ,  $P = 0,25$ ). **b)** Relación entre la tasa de transporte de electrones que dirige la regeneración de RuBP ( $J_{max}$ ), calculada sobre la base de  $C_i$ , y la concentración de Nitrógeno por unidad de área foliar ( $N_a$ ). Esta relación fue significativa, expresado por  $J_{max} = 67 + 0,092N_a$ ,  $r^2 = 0,67$ ,  $P < 0,05$ . Los interceptos fueron significativamente diferentes entre las especies ( $F_{2,38} = 33,85$ ,  $P < 0,001$ ), no así las pendientes ( $F_{2,38} = 1,05$ ,  $P = 0,36$ ). **c)** Relación entre la tasa máxima de carboxilación de Rubisco ( $V_{cmax}$ ), calculada sobre la base de  $C_c$ , y la concentración de Nitrógeno por unidad de superficie foliar ( $N_a$ ). El ajuste fue significativo, dado por  $V_{cmax} = 48,625 + 0,128N_a$ ,  $r^2 = 0,63$ ,  $P < 0,01$ . Los interceptos del ajuste fueron significativamente diferentes entre las especies ( $F_{2,38} = 26,72$ ,  $P < 0,001$ ), no así los interceptos, cuyas diferencias no fueron significativas ( $F_{2,38} = 0,67$ ,  $P = 0,51$ ). **d)** Relación entre la tasa de transporte de electrones

que dirige la regeneración de RuBP ( $J_{\max}$ ), calculada sobre la base de  $C_c$ , y la concentración de Nitrógeno por unidad de área foliar ( $N_a$ ). Esta relación fue significativa, expresado por  $J_{\max} = 74,27 + 0,108N_a$ ,  $r^2 = 0,7$ ,  $P < 0,05$ . Los interceptos fueron significativamente diferentes entre las especies ( $F_{2,38} = 41,34$ ,  $P < 0,001$ ), no así las pendientes ( $F_{2,38} = 1,43$ ,  $P = 0,25$ ).

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 FACTORES QUE LIMITAN LA ASIMILACIÓN DEL CO<sub>2</sub>

Varios autores (Farquhar *et al.*, 1980; von Caemmerer y Farquhar, 1981; Leuning, 1995) señalan que la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> en una hoja es influenciada, principalmente, por la nutrición, el régimen lumínico, la edad foliar y el estrés hídrico de la planta, entre otros factores. von Caemmerer y Farquhar (1981), indican que los cambios en la asimilación del CO<sub>2</sub> reflejan cambios en la conductancia de los estomas y del mesófilo, y que la capacidad de conductancia del mesófilo depende de la actividad de la enzima Rubisco y de la tasa de transporte de electrones que dirige la regeneración de RuBP. En este estudio los parámetros controlados corresponden principalmente a la cantidad de irradiación y al contenido de CO<sub>2</sub>, analizados a través de las curvas de respuesta a la fotosíntesis a una temperatura de 25°C.

Lambers *et al.*, (2008), indican que los cambios dinámicos en el régimen lumínico en hojas de plantas C<sub>3</sub> que inciden en la tasa de transporte de electrones son explicados a través de las curvas  $A/Q$ , gráficas de respuesta a la tasa de asimilación versus la irradiación a la hoja, en donde la pendiente inicial representa el rendimiento cuántico aparente (respuesta basada en la luz incidente) y la fotosíntesis se encuentra limitada por el transporte de electrones debido a la baja incidencia de luz, una vez superado el umbral en donde la fotosíntesis neta es mayor a 0, es decir, sobre el punto de compensación de luz, la asimilación se ve limitada por la tasa de carboxilación de la Rubisco, la cual se rige por la difusión del CO<sub>2</sub> en la hoja, la que disminuye al aumentar la temperatura. En cuanto a estos parámetros, señalan que el valor de  $\alpha$  es alrededor de 0,06 moles de CO<sub>2</sub> fijados por mol de fotones, en donde el rol es explicar en qué medida la luz incidente es aprovechada para la fijación de carbono, cuyo valor en este estudio alcanzó los 0,033 moles de CO<sub>2</sub> fijados. Otro componente, que influye en la fotosíntesis, es la tasa de respiración ( $R_{d,(AQ)}$ ) en la oscuridad que incide en la determinación del punto de compensación de la luz, momento en donde la fotosíntesis neta es igual a cero, alcanzando en este estudio una tasa promedio de 0,77  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , independiente de la especie.

Considerando la modificación de las concentraciones externas de CO<sub>2</sub>, von Caemmerer y Farquhar (1981) explican que la asimilación neta de CO<sub>2</sub> es gobernada por diferentes procesos, dependiendo del nivel de concentración de CO<sub>2</sub> al que se encuentra expuesta la planta, señalando que, a bajas concentraciones la fotosíntesis se encuentra limitada por la tasa de carboxilación de la Rubisco mientras que a altas concentraciones se ve limitada por la regeneración de RuBP, lo que a su vez depende de la tasa de transporte de electrones, bajo condiciones de saturación lumínica. Así mismo, Lambers *et al.* (2008) explican la importancia de las curvas de demanda de CO<sub>2</sub> en las plantas C<sub>3</sub> (curvas  $A/C_i$ ), donde en primera instancia el aumento de CO<sub>2</sub> no aumenta la asimilación neta de la fotosíntesis debido a la producción de CO<sub>2</sub> por respiración (fotorrespiración y algo de “respiración oscura” que ocurre en la luz), hasta llegar al punto de compensación de CO<sub>2</sub>, en donde la asimilación neta es igual a cero y es, en gran medida, determinado por la actividad de la Rubisco. En plantas C<sub>3</sub> éste punto se encuentra entre los 40 – 50  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , a 25°C y presión atmosférica, encontrándose en este estudio valores entre los 49 – 51  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ . Las plantas bajo condiciones ambientales favorables operan en el rango donde la

carboxilación y la cadena de transporte de electrones colimitan la tasa de asimilación, permitiendo un uso efectivo de los recursos de las reacciones lumínicas y oscuras (Lambers *et al.*, 2008).

En cuanto a las condiciones de nutrición, específicamente sobre el contenido de nitrógeno almacenado ( $N_a$ ), se señala que, junto con el área foliar específica ( $AFE$ ), ambos parámetros contribuyen a aumentar la capacidad fotosintética en las hojas, dado que la acumulación de nitrógeno por unidad de masa requiere de hojas de gran espesor y bajo  $AFE$  (Reich *et al.*, 1999). Sin embargo, algunos autores demuestran que hojas gruesas con bajo  $AFE$  tienen bajas tasas fotosintéticas debido a la limitación del flujo de  $CO_2$  y luz hacia los sitios de carboxilación (Lloyd *et al.*, 1992 citados por Gulías *et al.*, 2003).

### 5.1.1 Limitaciones dadas por la conductancia estomática y del mesófilo

Los resultados muestran un gradiente de disminución en la conductancia del  $CO_2$  desde el exterior de la hoja hacia los sitios de carboxilación, explicado por la concentración relativa de  $CO_2$  ( $C_a > C_i > C_c$ ). Las diferencias entre  $C_a$  y  $C_i$  alcanzan un promedio de  $32 \mu\text{mol mol}^{-1}$  mientras que las diferencias entre las concentraciones de  $C_i$  y  $C_c$  alcanzan los  $131 \mu\text{mol mol}^{-1}$ . Éstas diferencias explican los valores obtenidos para  $g_s$  y  $g_m$ , ya que a mayor conductancia estomática, menor es la diferencia en la difusión del  $CO_2$  entre el ambiente ( $C_a$ ) y los espacios intercelulares ( $C_i$ ), a diferencia de lo explicado por el bajo valor de  $g_m$ , lo que implica una mayor diferencia en la difusión del  $CO_2$  desde los espacios intercelulares ( $C_i$ ) hacia los cloroplastos ( $C_c$ ). Lo mismo se explica a través de las limitaciones, en donde el bajo valor de  $L_s$  está dado por la mayor conductancia estomática y por tanto menor diferencia entre  $C_a$  y  $C_i$ , y el alto valor de  $L_m$  está dado por la menor difusión a través del mesófilo, y por tanto una mayor diferencia entre  $C_i$  y  $C_c$ .

Los valores obtenidos para  $g_s$  son mayores a los obtenidos para  $g_m$ , lo que indica que existe una menor resistencia al flujo de  $CO_2$  desde el exterior hacia los espacios intercelulares lo que puede ser explicado por el comportamiento propio de los estomas en hojas de este tipo de especies como una medida de adaptación a condiciones áridas (Beyschlag *et al.*, 1992). A pesar de esto, Medrano *et al.* (2002), destacan las diferencias existentes en la regulación estomáticas a nivel de especies y genotipos en cuanto a la regulación hídrica y otros parámetros.

Farquhar y Sharkey (1982), indican que la limitación estomática aumenta a medida que aumentan las condiciones de estrés. Tenhunen *et al.* (1984 citados por Cabrera, 2002) indican que una disminución de  $g_s$  es común en especies esclerófilas sometidas a mayores horas de calor durante el día, aún en ausencia de un estrés hídrico, lo cual resulta en una disminución de la fotosíntesis neta. Esto debido a que se busca mantener el contenido humedad y evitar la pérdida de agua por evapotranspiración, tendiendo a un cierre parcial de estomas para su control lo que reduce, durante las horas de mayor calor, la fotosíntesis neta y la asimilación de  $CO_2$  acompañado de una mayor difusión del  $O_2$ .

En cuanto a la conductancia del mesófilo, los reportes encontrados señalan que  $g_m$  cambia con mayor rapidez frente a las modificaciones ambientales, en comparación a  $g_s$  (Lambers *et al.*, 2008), y que su magnitud varía ampliamente entre especies correlacionándose con la

capacidad fotosintética,  $A$ , de la hoja, siendo mayor en especies esclerófilas (Niinemets *et al.*, 2009b). Evans *et al.* (2009) indican que la compleja estructura del mesófilo varía entre especies y tasas de irradiación, dado que la difusión a través de los espacios intercelulares puede estar influenciada por el espesor de la hoja, la forma de las células y la posición relativa del conjunto de estomas. Por otra parte Niinemets *et al.* (2009b) demuestran la relación existente entre  $g_m$  y la estructura de la hoja (espesor, peso seco y densidad) en especies esclerófilas, en donde se concluye que la conductancia del mesófilo es menor en hojas estructuralmente más robustas, presentando mayor limitación a la fotosíntesis.

Singsaas *et al.* (2003), observan que el gradiente de concentración, específicamente las diferencias dadas entre  $C_i - C_c$ , no influyen de manera sistemática en la capacidad de asimilación de la hoja para especies  $C_3$ , encontrando una relación entre  $g_m$  y la capacidad fotosintética a través de las especies estudiadas, independiente de la localidad de crecimiento y la concentración de  $CO_2$  al que fueron expuesto.

En cuanto a estas especies, varios autores señalan que la reducción del contenido de  $CO_2$  desde espacios intercelulares hacia los cloroplastos es mayor en especies esclerófilas (Lambers *et al.*, 2008; Lloyd *et al.*, 1992 citado por Gulías *et al.*, 2003; Niinemets *et al.*, 2009b; Singsaas *et al.*, 2003), presentando mayores limitaciones a la fotosíntesis.

No existe suficiente evidencia en cuanto a valores observados en conjunto para  $g_s$  y  $g_m$  en hojas de especies mediterráneas bajo condiciones de no estrés, permitiendo solo la comparación entre los valores obtenidos.

A pesar de que  $g_m$  presenta diferencias significativas, la proporción entre ambas conductancias dado por  $g_m/g_s$  no presentó diferencias entre las especies. Este parámetro, que explica la proporcionalidad de la conductancia del mesófilo en relación a la conductancia estomática, alcanzó los  $0,47 \pm 0,08$  lo que indica que la conductancia estomática es proporcionalmente mayor en comparación a otras latifoliadas con valores cercanos a 1 (De Lucía *et al.*, 2003).

Aún cuando en el presente estudio no se encontró una relación lineal entre  $g_s$  y otros parámetros como  $g_m$  y  $A_{sat}$ , Medrano *et al.*, (2002) indican que tanto especies esclerófilas como *Vitis vinífera L.* tienden a mostrar una relación común entre  $A$  (fotosíntesis bruta) y  $g_s$ , pero presenta algunas divergencias cuando se presenta entre  $A_{sat}$  (tasa de fotosíntesis) y  $g_s$  en especies esclerófilas, lo que podría reflejar la alta limitación impuesta por el mesófilo en este tipo de especies. Esto debido a que especies leñosas y esclerófilas tienen una mayor resistencia del mesófilo que las especies mesofíticas.

Considerando la relación entre  $g_m$  con otros parámetros,  $g_m/N_a$  no muestra una relación lineal positiva, mientras que  $g_m/A_{sat}$  sí presentan esta relación, lo que es consistente a lo encontrado en la literatura (Lambers *et al.*, 2008; Singsaas *et al.*, 2003) bajo distintos escenarios de estrés y de no estrés (Warren *et al.*, 2003; Flexas *et al.*, 2004 citado por Grassi y Magnani, 2005; Niinemets *et al.*, 2009a). Esto refleja la influencia que tiene la conductancia del mesófilo en la capacidad fotosintética de las hojas dado principalmente por la actividad bioquímica que se presenta en los cloroplastos.

En cuanto a los resultados obtenidos para las limitaciones,  $L_m$  y  $L_s$ , éstos son consistentes si analizamos el hecho de que las diferencias entre el gradiente de concentración  $C_a-C_i$ ,  $C_i-C_c$  son mayores al llegar al mesófilo, quien impone mayor resistencia al flujo de  $\text{CO}_2$ , sin diferencias significativas entre las especies. Hecho que además concuerda con lo expuesto por diferentes autores (Medrano *et al.*, 2002; Gulías *et al.*, 2003; Lambers *et al.*, 2008) de manera teórica y demostrado por Bown *et al.* (2009) en estudios para *Pinus radiata*, en donde la limitación dada por el mesófilo es ligeramente mayor a la impuesta por los estomas, bajo distintos escenarios de fertilización y con distinto material genético (clones). Los valores para  $L_s$  se mantienen constantes entre las especies, sin diferencias significativas, lo que concuerda con los valores obtenidos para  $g_s$ . Aún cuando  $g_m$  presenta diferencias entre las especies,  $L_m$  no, lo que puede ser explicado por la correlación lineal entre  $g_m$  y la tasa fotosintética, cuya proporcionalidad no presenta diferencia entre las especies.

### 5.1.2 Limitaciones bioquímicas a la actividad fotosintética

Los parámetros bioquímicos de la fotosíntesis son aquellos que explican el funcionamiento del proceso fotosintético en términos biológicos y químicos. En términos simples éstos parámetros están relacionados con todo tipo de reacciones químicas que suceden en la hoja y que permiten describir el proceso de asimilación del  $\text{CO}_2$ , como lo son la tasa de transporte de electrones que dirige la regeneración de RuBP ( $J_{\max}$ ), quien permite llevar a cabo la captación del  $\text{CO}_2$ , la tasa de carboxilación de la Rubisco ( $V_{\text{cmax}}$ ) enzima encargada de efectuar la reacción de asimilación entre RuBP y el  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ . Existen también otros parámetros que a su vez influyen en el comportamiento de  $J_{\max}$  y  $V_{\text{cmax}}$ , como lo son el rendimiento cuántico aparente, el contenido de nitrógeno y el punto de compensación del  $\text{CO}_2$ , entre otros.

En relación a las tasas fotosintéticas,  $A_{\text{sat}}$ , en base a estudios en especies mediterráneas, los valores para éste parámetro fluctúan entre los 17 y 19  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  a comienzos de verano, período en donde existe un desarrollo foliar completo y una óptima disponibilidad de agua (Grassi y Magnani, 2005). El presente estudio alcanza valores menores, tanto para  $A_{\text{sat}}$  como para  $A_{\text{sat}400\text{Aci}}$ , a los expuestos por Grassi y Magnani (2005), aún cuando las condiciones consideran una óptima disponibilidad de agua en las plántulas (muestras) utilizadas. Estos bajos valores, en comparación al estudio mencionado, pueden ser explicados por las diferencias entre las muestras utilizadas desde el punto de vista de especies y estado de desarrollo.

En cuanto a los parámetros obtenidos de las curvas  $A/C_i$ ,  $J_{\max}$  y  $V_{\text{cmax}}$ , estos fueron recalculados considerando la influencia del mesófilo en la conductancia del  $\text{CO}_2$ , es decir, considerando la concentración de  $\text{CO}_2$  en los cloroplastos, estimándose que tanto  $J_{\max,\text{cc}}$  como  $V_{\text{cmax},\text{cc}}$  presentan mayores valores a los dados para  $J_{\max,\text{ci}}$  y  $V_{\text{cmax},\text{ci}}$ , obtenidos en base a la concentración de  $\text{CO}_2$  en los espacios intercelulares. Las diferencias entre las estimaciones realizadas se relacionan con la baja conductancia del mesófilo, Niinemets *et al.* (2009a) indican que el cálculo de  $V_{\text{cmax}}$  a través del ajuste convencional, es decir, considerando valores  $C_i$  de la parte baja de la curva  $A/C_i$ , subestima hasta 3 veces éste parámetro en hojas con bajo  $g_m$ .

Las tasas de respiración también aumentan con el cálculo en base a  $C_c$ . Aún cuando no se encontraron datos sobre estos parámetros, es de esperar que tanto para  $J_{\max}$  y  $V_{\max}$  como para  $R_d$  los valores aumenten al considerar la real concentración de  $\text{CO}_2$  cloroplástica que en definitiva determina el alcance del proceso fotosintético, subestimando su valor al calcular estos parámetros en base a la concentración de  $\text{CO}_2$  intercelular (Grassi y Magnani, 2005).

Grassi y Magnani (2005), muestran que la pendiente entre  $V_{\max,ci}$  y  $V_{\max,cc}$  alcanza un valor de 1,62 ( $r^2 = 0,94$ ), demostrando que el cálculo en base a  $C_i$  subestima la real capacidad fotosintética de la hoja. Esta pendiente entre  $V_{\max,ci}$  y  $V_{\max,cc}$  es relativamente cercana a la encontrada en el presente estudio en donde se calcula en 2,03 ( $r^2 = 0,76$ ), lo cual explica la relación entre ambos parámetros. No obstante, consistente con la relación entre  $V_{\max}$  y  $A_{\text{sat}}$ , los valores de  $V_{\max}$  encontrados son menores que los reportados en literatura para especies esclerófilas, con bajos valores para  $A_{\text{sat}}$ .

La proporción entre  $J_{\max}/V_{\max}$  indica la distribución de las proteínas en las reacciones luminosas y oscuras de la fotosíntesis, además determina la sensibilidad de la fotosíntesis a la luz y temperatura, por ejemplo, el punto de transición al cual una limitación predomina sobre otra (Niinemets *et al.*, 2009a). En cuanto a la magnitud de esta proporción, Niinemets *et al.* (2009a) indican que para parámetros calculados en base a  $C_i$  el valor puede ser mayor a 6,7, valor alto en comparación al calculado en base a  $C_c$ , estimado en 2. No obstante, los valores observados para esta proporción alcanzaron los 2,29 en base a  $C_i$  y 1,38 para valores observados en base a  $C_c$ . Esto además se sustenta con la observación de que  $V_{\max}$  presentó los mayores aumentos una vez recalculados en base a  $C_c$ , lo que explica los menores valores obtenidos para  $J_{\max,cc}/V_{\max,cc}$ .

Es importante destacar que la interpretación de  $J_{\max}/V_{\max}$  depende en gran parte de  $g_m$ , independiente del tipo de ajuste (si es en base a  $C_i$  o  $C_c$ ). La sensibilidad de la fotosíntesis a este parámetro es menor en hojas con bajo  $g_m$ , debido a que con una disminución, la fotosíntesis es generalmente más limitada por la Rubisco que por el transporte de electrones debido a una baja concentración de  $\text{CO}_2$  en los cloroplastos. De esta manera, la tasa de fotosíntesis puede incrementar en mayor medida debido a que se prefiere invertir en Nitrógeno (N) para Rubisco que en el transporte de electrones, en hojas con bajo  $g_m$ . De hecho esto se encuentra fuertemente representado en hojas esclerófilas con bajo  $g_m$ , con grandes inversiones en nitrógeno (Niinemets *et al.*, 2009a).

## 5.2 COMPARACIÓN DE PARÁMETROS ENTRE LAS ESPECIES.

Las diferencias vistas en  $N_a$  son consistentes con las dadas para el área foliar específica de las muestras, encontrando un mayor contenido de nitrógeno y  $AFE$  en hojas analizadas de Peumo y Quillay, sin diferencias significativas entre los valores obtenidos. Los altos niveles de  $A_{\text{sat}}$  obtenidos para Quillay, en comparación a las otras dos especies, indican que esta es más eficiente en el uso de este elemento para el proceso fotosintético, explicado por un alto valor en la eficiencia en el uso del nitrógeno,  $E_n$ , seguido por Litre y finalmente Peumo, aún cuando ésta última presente altos valores de  $N_a$ .

A diferencia de lo que se puede suponer debido a las diferencias en las tasas fotosintéticas, el rendimiento cuántico aparente en estas especies, menor al encontrado en la literatura, no presenta diferencias significativas. Esto indica que la eficiencia en el uso de la luz, dado por la pendiente inicial de la curva  $A/Q$ , tiene el mismo comportamiento entre las especies. De la misma manera, la tasa de evapotranspiración ( $E$ ) y la eficiencia en el uso del agua ( $1/UEA$ ) no presentan diferencias significativas entre las especies, lo que indica que tanto la salida de  $H_2O$ , como su absorción por mol de  $CO_2$ , presentan también un mismo comportamiento lo que demuestra que este recurso es similarmente absorbido en estas condiciones experimentales. Estos parámetros pueden explicar las estrategias adoptadas por estas especies esclerófilas en cuanto a la captación de la luz y agua, factores que determinan y caracterizan el tipo de ecosistema en donde éstas especies se desarrollan.

Considerando que los valores de  $V_{cmax}$  y  $J_{max}$  muestran una relación lineal con el contenido de nitrógeno foliar ( $N_a$ ) (Field y Mooney, 1986), la mayor eficiencia en el uso del nitrógeno ( $E_n$ ) implica una menor limitación bioquímica, referido al menos por el uso y disponibilidad de este elemento para Quillay debido a los altos valores observados para  $V_{cmax}$ , calculados tanto en base a  $C_i$  como  $C_c$ . En cuanto a  $J_{max}$ , Quillay presentó los mayores valores en ambos cálculos, seguido por Peumo y Litre. Esto indica la mayor eficiencia del Quillay para llevar a cabo el proceso fotosintético aún cuando las tres especies tengan el mismo comportamiento para la captura de luz y  $CO_2$ .

Por otro lado, las tasas de respiración mitocondrial obtenidas desde las diferentes curvas no presentan un claro comportamiento entre las especies, sin embargo, puede ser analizada considerando los puntos de compensación de  $CO_2$  intercelular ( $C_i^*$ ) en donde existen diferencias significativas siendo Quillay el de mayor valor, seguido por Litre y finalmente Peumo. A diferencia del contenido intercelular, el punto de compensación de  $CO_2$  ( $\Gamma^*$ ) en los cloroplastos no presentó diferencias significativas entre las especies, sin embargo, presentaron mayores valores en comparación a  $C_i^*$ . Esto debido a la subestimación que ocurre al considerar y realizar cálculos en base al  $C_i$ .

Peumo presenta una respuesta similar a la observada para Quillay en relación a los parámetros que explican la capacidad fotosintética, siendo Litre quien obtiene los menores valores, con diferencias significativas. Esto indica que aún cuando estas especies se desarrollan en un mismo ecosistema, existen diferencias desde el punto de vista estratégico para la supervivencia, siendo Peumo y Quillay especies que presentan mayores tasas fotosintéticas, lo que implica mayor absorción de  $CO_2$  y consecuentemente mayor uso de agua, en comparación a Litre que presenta menores tasas fotosintéticas y consumo de agua.

## 6. CONCLUSIONES

La difusión del CO<sub>2</sub> desde la atmósfera hacia los sitios de carboxilación en los cloroplastos, explicado por la conductancia estomática ( $g_s$ ) y del mesófilo ( $g_m$ ), alcanzó mayores valores a nivel estomático para todas las especies, sin diferencias entre ellas. El bajo valor de  $g_m$ , común en este tipo de especies, se explica como una medida de adaptación de estas a ambientes extremos, regulando hacia abajo la tasa de fotosíntesis y consumo de agua.

Los principales parámetros bioquímicos,  $J_{max}$  y  $V_{cmax}$  se obtuvieron considerando las concentraciones intercelulares ( $C_i$ ) y cloroplásticas ( $C_c$ ), donde quedó en evidencia la real subestimación que existe al realizar las estimaciones en base a  $C_i$  al no considerar un flujo finito a través del mesófilo, lo que anteriormente se asumía como infinito o bien muy pequeño para ser considerado. Sin embargo, hoy se sabe la importancia que tiene este parámetro para el cálculo de la tasa de asimilación.

En cuanto a las limitaciones se observó que las restricciones impuestas a la difusión del CO<sub>2</sub> no presentan diferencias entre las especies, obtenidas en base a los valores dados por la conductancia estomática y del mesófilo y las concentraciones relativas de CO<sub>2</sub>. Se evidenció una mayor restricción del mesófilo, común en este tipo de especies, en contraste con una menor restricción a nivel de estomas dado por una mayor conductancia estomática ( $g_s$ ).

Las limitaciones producidas a nivel bioquímico relacionadas a la actividad en los cloroplastos y explicado a través de distintos parámetros, principalmente  $V_{cmax}$  y  $J_{max}$  estimados tanto en base a  $C_i$  como a  $C_c$ , muestran diferencias entre las especies lo que implica que la actividad bioquímica limita a la fotosíntesis tanto a nivel de especie como ecosistémico.

Se evidenció cierta similitud entre especies en parámetros relacionados directamente con las condiciones ambientales, como disponibilidad de agua (EUA,  $E$ ), el aprovechamiento de la luz ( $\alpha$ ) y concentración de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ,  $C_c$ ); visto como el resultado adaptativo de estas especies a los factores ambientales que caracterizan este tipo de ambientes.

Considerando los parámetros bioquímicos, Quillay obtuvo los mayores valores desde el punto de vista de eficiencia fotosintética, con una mayor actividad de difusión del CO<sub>2</sub> hacia los sitios de carboxilación ( $g_m$ ), mayor actividad bioquímica ( $J_{max}$ ,  $V_{cmax}$ ), mayor tasa fotosintética ( $A_{sat}$ ), junto a una mayor eficiencia en el uso de nitrógeno ( $E_n$ ). Esto indica que esta especie presenta mejores condiciones fisiológicas para su crecimiento en comparación a las otras.

La especie Litre presentó los menores valores de fotosíntesis y consumo de agua, lo que implica que esta especie presenta mayores restricciones, en comparación a Quillay y Peumo, lo que también puede ser visto como una estrategia adaptativa de sobrevivencia frente a condiciones ambientales extremas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- BERNACCHI, C. J., SINGSAAS, E.L., PIMENTEL, C., PORTIS JR, A.R. y LONG, S.P., 2001. Improved temperature response functions for models of Rubisco-limited photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 24: 253-259.
- BERNACCHI, C. J., PORTIS, A.R., NAKANO, H., VON CAEMMERER, S. y LONG, S.P., 2002. Temperature response of mesophyll conductance. Implications for the determination of Rubisco enzyme kinetics and for limitations to photosynthesis in vivo. *Plant Physiology* 130: 1992-1998.
- BEYSCHLAG, W., PFANZ H. y RYEL, R., 1992. Stomatal patchiness in Mediterranean evergreen sclerophylls. *Planta* 187: 546-553.
- BOWN, H. E., WATT, M.S., CLINTON, P.W., MASON, E.G. y RICHARDSON, B., 2007. Partitioning concurrent influences of nitrogen and phosphorus supply on photosynthetic model parameters of *Pinus radiata*. *Tree Physiol* 27: 335-344.
- BOWN, H., WATT, M., MASON, E., CLINTON, P. y WHITEHEAD, D., 2009. The influence of nitrogen and phosphorous supply and genotype on mesophyll conductance limitations to photosynthesis in *Pinus Radiata*. *Tree Physiology* 29: 1143-1151.
- CABRERA, M., 2002. Respuestas ecofisiológicas de plantas en ecosistemas de zonas con clima mediterráneo y ambientes de altamontaña. *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 625-637.
- CHAPIN, F. S., MATSON, P. y MOONEY, H., 2002. Principles of terrestrial Ecosystem Ecology. Springer Science+Business Media. New York, U.S.A. 423 p.
- DE LUCIA, E., WHITEHEAD, D. Y CLEARWATER, M., 2003. The relative limitation of photosynthesis by mesophyll conductance in co-occurring species in a temperate rainforest dominated by the conifer *Dacrydium cupressinum*. *Functional Plant Biology* 30: 1197-1204.
- EVANS, J., KALDENHOFF, R., GENTY, B. y TERASHIMA, I., 2009. Resistances along CO<sub>2</sub> diffusion pathway inside leaves. *Journal Experimental Botany* 60: 2235 - 2248.
- FARQUHAR, G. D., VON CAEMMERER, S. y BERRY, J.A., 1980. A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta* 149: 78-90.
- FARQUHAR, G. D. y SHARKEY, T.D., 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*. 33: 317-345.
- FIELD, C. y MOONEY, H., 1986. The photosynthesis-nitrogen relationship in wild plants. En: GIVNISH, T.J. (Ed), *The Economy of plant form and function*. Cambridge University Press, Cambridge. Pp 25-55.

GENTY, B., BRIANTAIS, J. y BAKER, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87-92.

GRACIA, C. A., SABATÉ, S. y SÁNCHEZ, A., 2002. El cambio climático y la reducción de la reserva de agua en el bosque mediterráneo. *Ecosistemas* 11: 1697-2473.

GRASSI, G. y MAGNANI, F., 2005. Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant Cell and Environ* 28: 834-849.

GULÍAS, J., FLEXAS, J., MUS, M., CIFRE, J., LEFI, E. y MEDRANO, H., 2003. Relationship between Maximum Leaf Photosynthesis, Nitrogen Content and Specific Leaf Area in Balearic Endemic and Non-endemic Mediterranean Species. *Annals of Botany* 92: 215-222.

HARLEY, P. C., LORETO, F., DI MARCO, G. y SHARKEY, T.D., 1992. Theoretical considerations when estimating the mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> flux by analysis of the response of photosynthesis to CO<sub>2</sub>. *Plant Physiology* 98: 1429-1436.

HARLEY, P. C. y SHARKEY, T.D., 1991. "An improved model of C<sub>3</sub> photosynthesis at high CO<sub>2</sub>: Reversed O<sub>2</sub> sensitivity explained by lack of glycerate reentry into the chloroplast." *Photosynthesis Research* 27: 169-178.

HEIMANN, M. y REICHSTEIN, M., 2008. Terrestrial ecosystem carbon dynamics and climate feedbacks. *Nature* 451: 289 - 292.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC), 2007. Summary for Policymakers. B. Metz, Davidson, O.R., Bosch, P.R., Dave, R., Meyer L.A. En: *Climate Change 2007: Mitigation. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* Cambridge. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York. N.Y., U.S.A. 24 p.

JONES, H. G., 1992. *Plants and Microclimate: A Quantitative Approach to Environmental Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 310 p.

LAMBERS, H., CHOPIN, F. y PONS, T., 2008. *Plant Physiological Ecology*. Springer Science+Business Media. New York, U.S.A. 591 p.

LANDSBERG, J., 2003. Modeling forest ecosystems: state of the art, challenges, and future directions. *Canadian Journal of Forest Research* 33: 385 - 397.

LEUNING, R., 1995. A critical appraisal of a combined stomatal-photosynthesis model for C<sub>3</sub> plants. *Plant, Cell and Environment* 18: 339-355.

LORETO, F., HARLEY, P.C., DI MARCO, G. y SHARKEY, T.D., 1992. Estimation of mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> flux by three different methods. *Plant Physiology* 98: 1437-1443.

- MEDRANO, H., ESCALONA, J.M., BOTA, J., GULÍAS, J. y FLEXAS, J., 2002. Regulation Photosynthesis of C<sub>3</sub> plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany* 89: 895-905.
- NIINEMETS, Ü., DÍAZ, A., FLEXAS, J., GALMÉS, J. y WARREN, R., 2009a. Importance of mesophyll diffusion conductance in estimation of plant photosynthesis in the field. *Journal of Experimental Botany* 60(8): 2271 - 2282.
- NIINEMETS, Ü., WRIGHT, I. y EVANS, J., 2009b. Leaf mesophyll diffusion conductance in 35 Australian sclerophylls covering a broad range of foliage structural and physiological variation. *Journal Experimental Botany* 60(8): 24333-22449.
- PEREZ, E., 2009. Fotosíntesis: Aspectos básicos. Serie de Fisiología Vegetal. *Reduca* 2(3): 1 - 47.
- PONS, T. L., FLEXAS, J., VON CAEMMERER, S., EVANS, J.R., GENTY, B., RIBAS-CARBÓ, M., BRUGNOLI, E., 2009. Estimating mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>: methodology, potential errors, and recommendations. *Journal of Experimental Botany* 8(60): 2217–2234.
- PRIOUL, J. L. y CHARTIER, P., 1977. Partitioning of transfer and carboxylation components of intracellular resistance to photosynthesis CO<sub>2</sub> fixation: a critical analysis of the methods used. *Annals of Botany* 41: 789-800.
- REICH B., ELLSWORTH S., WALTERS B., VOSE M., GRESHAM C., VIOLIN J.C. y BOWMANN WD., 1999. Generality of leaf trait relationships: a test across six biomes. *Ecology* 80: 1955 - 1969.
- SCHREIBER, U., BILGER, W. y NEUBAUER, C., 1994. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. *Ecophysiology of photosynthesis*. E. D. Schulze and M. M. Caldwell. Berlin, Springer Verlag: 49-70.
- SHARKEY, T. D., 1985. Photosynthesis in intact leaves of C<sub>3</sub> plants: physics, physiology and rate limitations. *The Botanical Review* 51(1): 54-105.
- SINGSAAS, E. L., ORT, D.R. y DE LUCIA, E.H., 2003. Elevated CO<sub>2</sub> effects on mesophyll conductance and its consequences for interpreting photosynthetic physiology. *Plant, Cell and Environment* 27: 41-50.
- VON CAEMMERER, S., 2000. Biochemical models of leaf photosynthesis. CSIRO Publishing. Collingwood, Victoria, Australia. 145 p.
- VON CAEMMERER, S. y FARQUHAR, G.D., 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153: 376-387.
- WARREN, C. R., ETHIER, G.J., LIVINGSTON, N.J., GRANT, N.J., TURPIN, D.H., HARRISON, D.L. y BLACK, T.A., 2003. Transfer conductance in second growth

Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) canopies. *Plant, Cell and Environment* 26: 1215-1227.

WARREN, C. R., 2006. Why does photosynthesis decrease with needle age in *Pinus pinaster*?. *Trees* 20: 157-164.

WARREN, C. R. y ADAMS, M.A., 2006. Internal conductance does not scale with photosynthetic capacity: implications for carbon isotope discrimination and the economics of water and nitrogen use in photosynthesis. *Plant Cell and Environment* 29: 192-201.

WULLSCHLEGER, S. D., 1993. Biochemical limitations to carbon assimilation in C<sub>3</sub> plants - A retrospective analysis of the A/C<sub>i</sub> curves from 109 species. *Journal of Experimental Botany* 44(262): 907-920.

ZAVALA, M. A., URBIETA, I.R., BRAVO DE LA PARRA, R. y ANGULO, Ó., 2005. Modelos de proceso de la producción y dinámica del bosque mediterráneo. *Investigaciones Agrarias: Sistema de Recursos Forestales* 14(3): 482 - 496.