

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**  
**PROGRAMA DE POSTGRADO**  
**PROGRAMA MAGÍSTER EN CIENCIAS FORESTALES**



**CARACTERIZACIÓN ANATÓMICA Y FISIOLÓGICA DE  
RASGOS ASOCIADOS A LA ASIMILACIÓN DE CARBONO EN**  
*Araucaria araucana* (Molina) K. Koch

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS  
FORESTALES

Por

BETSY KARINA RIVERA BRIONES

PROFESOR GUÍA: PATRICIA SÁEZ  
PROFESOR CO-GUÍA: LOHENGRIN CAVIERES  
COMISIÓN: JERONI GALMÉS  
EUGENIO SANFUENTES

CONCEPCIÓN – CHILE

2022

**“CARACTERIZACIÓN ANATÓMICA Y FISIOLÓGICA DE RASGOS ASOCIADOS A LA ASIMILACIÓN DE CARBONO EN *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch”**

**Comisión evaluadora**

Patricia Sáez D. (Profesor guía)

Ingeniero Forestal, Dra.

---

Lohengrin Cavieres (Profesor co-guía)

Biólogo, Dr.

---

Jeroni Galmés (Comisión evaluadora)

Biólogo, Dr.

---

Eugenio Sanfuentes (Comisión evaluadora)

Ingeniero Forestal, Dr.



---

**Directora de Postgrado:**

Darcy Rios.

Profesora de Biología y Química, Dra.

---

## AGRADECIMIENTOS

A mi esposo por estar conmigo en las buenas y en las malas, y por entender este proceso y brindarme su apoyo.

A mis padres y hermanos por confiar en mí e impulsarme a seguir mis sueños.

A la Dra. Patricia Sáez por su dedicación y profesionalismo, por bríndame su ayuda y respaldo, impulsarme a continuar y finalizar este largo proceso de formación.

Al Dr. Jeroni Galmés y al Dr. Lohengrin Cavieres por su valiosa ayuda y asesoramiento en la estructura del proyecto, cuyas sugerencias e ideas fueron muy importantes para la realización de esta tesis.

A mis compañeras y compañeros del laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales que siempre han tenido excelente disposición para brindarme su ayuda, por ofrecer un ambiente agradable y familiar, y por ser un excelente grupo de profesionales y estudiantes donde la amistad y el respeto ha prevalecido a lo largo del tiempo.

A mis fieles amigas, Valentina Vallejos y Constanza Ramírez que sin ustedes este tiempo en el postgrado no hubiera sido igual, gracias por alentarme, muchas veces contenerme y entregarme su cariño.

Finalmente, quisiera agradecer el apoyo financiero de los proyectos Fondecyt 1191382, proyecto PGC2018-094621-B-I00 y Beca CONICYT Magíster.

## ÍNDICE DE MATERIAS

CAPÍTULO	PÁGINA
I. RESUMEN.....	4
II. ABSTRACT.....	5
III. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	6
IV. CAPÍTULO I: MORTALIDAD ARBÓREA: VISIÓN GENERAL DEL EFECTO DEL CAMBIO CLIMÁTICO EN LAS GIMNOSPERMAS .....	9
RESUMEN .....	10
INTRODUCCIÓN .....	11
1.1 Mortalidad arbórea y su relación con cambios en los patrones climáticos.....	13
1.2 Mortalidad arbórea en gimnospermas primitivas.....	14
1.3 Evolución de rasgos morfofisiológicos asociados a asimilación de carbono y posibles respuestas al fenómeno de mortalidad .....	16
1.4 Evolución de rasgos hidráulicos.....	18
1.5 Potencial riesgo de mortalidad asociado a lentas respuestas estomáticas: comparativa entre gimnospermas y angiospermas.....	19
1.5.1 Respuestas estomáticas a la luz. ....	20
1.5.2 Respuestas estomáticas al CO <sub>2</sub> .....	21
1.5.3 Respuestas estomáticas al déficit de presión de vapor.....	22
1.6 Respuestas fotosintéticas frente a sequía .....	23
1.7 Efectos de la sequía en la conductividad hidráulica foliar.....	24
1.8 <i>Araucaria araucana</i> : problemática sanitaria y su posible respuesta ante el cambio climático. ....	26
1.9 Observaciones finales .....	29
REFERENCIAS .....	31
V. CAPÍTULO II: ANATOMICAL AND BIOCHEMICAL EVOLUTIONARY ANCIENT TRAITS OF <i>Araucaria araucana</i> (Molina) K. Koch AND THEIR EFFECTS ON CARBON ASSIMILATION* .....	48
ABSTRACT .....	49
INTRODUCTION .....	50
MATERIALS AND METHODS .....	52
1.1 Plant material and experimental conditions .....	52

1.2 Stomatal traits and the theoretical maximum stomatal conductance.....	53
1.3 Gas exchange measurements.....	54
1.4 Stomatal response to different environmental conditions.....	56
1.5 Estimation of mesophyll conductance, chloroplast CO <sub>2</sub> concentration and analysis of quantitative limitations for photosynthesis .....	56
1.6 Anatomical determination of g <sub>m</sub> .....	57
1.7 Foliar structural measurements .....	57
1.8 Composition of the δ <sup>13</sup> C isotope and foliar nitrogen content .....	58
1.9 Kinetics and Rubisco specificity (S <sub>c/o</sub> ) .....	58
2.1 Statistical analysis .....	59
RESULTS.....	59
3.1 Stomatal traits and their response to different environmental conditions .....	59
3.2 Photosynthesis response to light, temperature and CO <sub>2</sub> concentration .....	64
3.3 Rubisco kinetic parameters and specificity factor.....	68
3.4 Anatomical g <sub>m</sub> and leaf structure .....	69
DISCUSSION.....	74
4.1 <i>A. araucana</i> has a notably slow stomatal response to light and CO <sub>2</sub> concomitant with evolutionary old anatomical traits .....	74
4.2 Stomatal conductance is the main determinant of photosynthesis in <i>A. araucana</i> and the stomatal limitation increases with temperature.....	75
4.3 Evolutionarily ancient Rubisco kinetic traits .....	78
CONCLUDING REMARKS AND PROSPECTS .....	79
ACKNOWLEDGMENTS.....	79
REFERENCES .....	81
VI. DISCUSIÓN GENERAL.....	90
VII. CONCLUSIONES GENERALES .....	94
REFERENCIAS .....	96
VIII. ANEXO .....	100

## ÍNDICE DE FIGURAS

### EN EL TEXTO

FIGURA	PÁGINA
<b>Fig. 1</b> (a) Scanning electron micrographs of abaxial leaf surface of <i>A. araucana</i> . ....	60
<b>Fig. 2</b> (a) Relationship between stomatal size (S) and stomatal density (SD) of <i>A. araucana</i> , fossil araucarias and fossil gymnosperms, and (b) the relationship between the total anatomical maximum stomatal conductance to water vapor ( $g_{wmax}$ ) and the atmospheric CO <sub>2</sub> concentration modelled for each fossil species. ....	62
<b>Fig. 3</b> (a) Stomatal response curve ( $g_s$ ) of <i>A. araucana</i> at photosynthetically active radiation, PAR ( $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (b) atmospheric CO <sub>2</sub> concentration, C <sub>a</sub> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ) and (c) vapor pressure deficit, VPD (kPa). ....	63
<b>Fig. 4</b> (a) The relationship between the stomatal conductance ( $g_s$ ), (b) the total leaf conductance to CO <sub>2</sub> , and (c) the maximum Rubisco carboxylation rate ( $V_{cmax}$ ) with the net photosynthetic CO <sub>2</sub> assimilation rate ( $A_N$ ) in <i>A. araucana</i> measured at leaf temperature of 20 °C and 25 °C. ....	67
<b>Fig. 5</b> (a) The relationship between the net photosynthetic CO <sub>2</sub> assimilation rate ( $A_N$ ) and the stomatal conductance ( $g_s$ ), and (b) the leaf mesophyll conductance ( $g_m$ ), (c) the relationship between $g_s$ and $g_m$ , and (d) the relationship between the intrinsic water use efficiency ( $A_N/g_s$ ) and the ratio $g_m/g_s$ . ....	68
<b>Fig. 6</b> (a) Leaf, (b) mesophyll transverse section, (c) mesophyll cell and (d) chloroplast of <i>A. araucana</i> .....	71
<b>Fig. 7</b> Distribution of leaf anatomical traits of <i>A. araucana</i> among gymnosperms and other ancient taxon. ....	72
<b>Fig. 8</b> The relationships between the leaf mass area (LMA) and (a) the net photosynthetic CO <sub>2</sub> assimilation rate ( $A_N$ ) at 20 °C, and (b) the leaf nitrogen for <i>A. araucana</i> (present study) and other gymnosperms. ....	73

EN EL ANEXO

## FIGURA

## PÁGINA

<b>Fig. S1</b> Relationship between size (S) and stomatal density (SD) of <i>A. araucana</i> from the present study, <i>A. araucana</i> and other non-fossil gymnosperms .....	100
<b>Fig. S3</b> (a) The net CO <sub>2</sub> assimilation rate (A <sub>N</sub> ) response to photosynthetic active radiation and (b) leaf temperature in <i>A. araucana</i> .....	102
<b>Fig. S4</b> Net photosynthesis (A <sub>N</sub> ) response curve to variant substomatal CO <sub>2</sub> concentration (C <sub>i</sub> ) of <i>A. araucana</i> measured at 20 °C and 25 °C.....	103
<b>Fig. S5</b> Comparison of the <i>in vitro</i> Rubisco kinetic parameters of <i>A. araucana</i> in the present study with those from a recent compilation of C <sub>3</sub> plants. ....	104
<b>Fig. S6</b> Correlation of the cell wall thickness with the leaf mass area in <i>A. araucana</i> . .....	105



## ÍNDICE DE TABLA

### CAPÍTULO I

TABLA	PÁGINA
<b>Tabla 1</b> Algunas preguntas abiertas que se podrían abordar en futuras investigaciones relacionadas con los efectos del cambio climático sobre los procesos hidráulicos y fotosintéticos, y los rasgos que ha adquirido <i>A. araucana</i> a lo largo de la historia evolutiva.....	29

### CAPÍTULO II

TABLA	PÁGINA
<b>Table 1</b> Stomata anatomical traits of <i>A. araucana</i> :.....	61
<b>Table 2</b> Parameters derived from the net CO <sub>2</sub> assimilation rate (A <sub>N</sub> ) response curve to light and temperature in <i>A. araucana</i> : .....	64
<b>Table 3</b> Photosynthetic parameters and quantitative analysis limitation of photosynthetic CO <sub>2</sub> assimilation of <i>A. araucana</i> measured at ambient CO <sub>2</sub> concentration and two measurement temperatures (20 °C and 25 °C). .....	65
<b>Table 4</b> <i>In vitro</i> Rubisco kinetic parameters of <i>A. araucana</i> measured at 25 °C. ....	69
<b>Table 5</b> The leaf mesophyll conductance for <i>A. araucana</i> modeled through anatomical parameters .....	70

### EN EL ANEXO

TABLA	PÁGINA
<b>Table S1</b> Maximum, minimum, and average daytime temperature recorded during the measurement days between January and June 2019 in the nursery of the University of Concepción.....	106



<b>Table S2</b> One-way analysis of variance (ANOVA) for photosynthesis-light curves (LC), photosynthesis-temperature curves (TC), quantitative limitations in plants measured at 20° C (QL20) and 25° C (QL25), and stomatal response curve to CO <sub>2</sub> (SRC), and t-test for independent samples by groups for stomatal responses curve to PAR (SRP) and VPD (SRV) in <i>A. araucana</i> .....	106
---	-----



## I. RESUMEN

Los eventos de mortalidad arbórea, asociados a los efectos del cambio climático, han incrementado notoriamente en los últimos años. *Araucaria araucana*, una de las coníferas más antiguas de hemisferio sur, parece no estar ajena a estos efectos. En los últimos años se ha observado una alta incidencia de daño foliar en esta especie, reportándose mortalidad de un importante número de individuos adultos y juveniles. A pesar de que los síntomas observados serían atribuidos a patógenos, su causa real aún no ha sido dilucidada. Así, algunos investigadores han indicado que la situación de *A. araucana*, no sólo responde a efectos bióticos, sino también abióticos, vinculados al cambio climático, por lo que se podría hipotetizar que su mortalidad sería causada por inanición de carbono, falla hidráulica y/o incrementos en la predisposición. Sin embargo, debido a la escasa información de los rasgos fisiológicos de esta especie, y en particular, de aquellos que subyacen a las hipótesis de mortalidad, la predicción de su respuesta frente a cambio climático es incierta. Gran parte de las características fisiológicas de las especies están determinadas por las condiciones ambientales en las cuales se han desarrollado, suscitando cambios foliares que determinan, entre otros, sus mecanismos fotosintéticos e hidráulicos. Considerando la importancia de estos mecanismos y su relación con el fenómeno de mortalidad, en esta tesis, se presenta en primer lugar, una revisión bibliográfica de los efectos de la sequía, producto del cambio climático, sobre los procesos fotosintéticos e hidráulicos de gimnospermas y su posible relación con el fenómeno de mortalidad; dejando en evidencia la escasa información que aún existe para especies evolutivamente antiguas, particularmente del hemisferio sur. En el capítulo dos, se presenta una caracterización anatómica y fisiológica de *A. araucana*, profundizando en rasgos difusivos del CO<sub>2</sub> y bioquímicos de Rubisco. Se evidencia que esta especie presenta rasgos morfofisiológicos primitivos que limitan la difusión y fijación de carbono a concentraciones actuales de CO<sub>2</sub> atmosférico, y que frente un ambiente más cálido, estas limitaciones podrían incrementar, restringiendo aún más su capacidad fotosintética. Estos resultados constituyen información base que servirá para entender la fisiología y las respuestas de araucaria frente a las variaciones ambientales, abriendo camino a un área no explorada para esta especie, y que puede contribuir al planteamiento de nuevos estudios para profundizar en sus respuestas frente a cambio climático y en particular, en las posibles causas de su mortalidad.

## II. ABSTRACT

Tree mortality events, associated with the effects of climate change, have increased notably in recent years. *Araucaria araucana*, one of the oldest conifers in the southern hemisphere, seems to be not far behind for these effects. In recent years a high incidence of foliar damage has been observed in this species, reporting mortality of a significant number of adult and juvenile individuals. Although the observed symptoms would be attributed to pathogens, their actual cause has not yet been elucidated. Thus, some researchers have indicated that the situation of *A. araucana* not only responds to biotic effects, but also abiotic linked to climate change, which could be associated with hypotheses of mortality due to carbon starvation, hydraulic failure and/or increases in predisposition. However, due to the scarce information on the physiological traits of this species, and in particular, on those that underlie the mortality hypotheses, the prediction of its response to climate change is uncertain. A large part of the physiological characteristics of the species are determined by the environmental conditions in which they have developed, causing leaf changes that determine, among others, their photosynthetic and hydraulic mechanisms. Considering the importance of these mechanisms and their relationship with the mortality phenomenon, this thesis first presents a review of the effects of drought, as a product of climate change, on the photosynthetic and hydraulic processes of gymnosperms and their possible relationship with the mortality phenomenon; leaving in evidence the scant information that still exists for evolutionarily ancient species, particularly from the southern hemisphere. In chapter two, an anatomical and physiological characterization of *A. araucana* is presented, delving into diffusive CO<sub>2</sub> and biochemical Rubisco traits. It is evidenced that this species presents primitive morphophysiological traits that limit the diffusion and fixation of carbon at the current CO<sub>2</sub> atmospheric concentrations, and that when faced with a warmer environment, these limitations could increase, further restricting its photosynthetic capacity. These results constitute base information that will serve to understand the physiology and responses of araucaria to environmental variations, opening the way to an unexplored area for this species, and that can contribute with new studies to deepen their responses to change climate and, in particular, in its possible causes of mortality.

### III. INTRODUCCIÓN GENERAL

En los últimos años, se ha reportado un incremento en los eventos de mortalidad de arboles, asociado principalmente al cambio climático y sus efectos sobre episodios de sequía de mayor frecuencia e intensidad (Allen *et al.*, 2010, 2015; IPCC, 2014). Las gimnospermas, uno de los grupos de plantas más antiguos de la Tierra, ha sido uno de los más afectadas por el cambio climático (Wang & Ran, 2014, Allen *et al.*, 2015; IPCC, 2021). El impacto de la sequía es especialmente evidente en gimnospermas del hemisferio norte, donde la incidencia de mortalidad ha aumentado drásticamente, mientras que en hemisferio sur todavía existe un escaso reporte (Allen *et al.*, 2015; Suarez *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2018). *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch es una de las coníferas más antiguas en América del Sur (Martín *et al.*, 2014), remontando su origen a la Era Mesozoica (Panti *et al.*, 2012). Actualmente, se encuentra categorizada en peligro de extinción para las poblaciones provenientes de la Cordillera de la Costa (Diario oficial, 2018) y como vulnerable por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) para la Cordillera de los Andes (IUCN, 1996). Al parecer, esta condición es consecuencia de la grave deforestación durante el siglo pasado y la disminución de su población por efecto de incendios y cambio climático (Pastorino & Marchelli, 2021). En Chile, se han reportado escasos eventos de muerte arbórea (Ramírez *et al.*, 2018), sin embargo, un informe de la Corporación Nacional Forestal (CONAF, 2018) reveló un incremento en el daño de poblaciones de *A. araucana*, presentando síntomas de necrosis en las hojas y ramas, avanzando desde la parte inferior de la corona a la superior, impulsada posiblemente por ataque de patógenos (Balocchi *et al.*, 2021). No obstante, se desconoce si este fenómeno estaría causando directamente la muerte de *A. araucana* o corresponde a un comportamiento oportunista impulsado por una falla metabólica, la cual podría responder a alguna de las hipótesis propuestas en mortalidad arbórea: inanición del carbono, falla hidráulica y/o predisposición a ataques de patógenos (McDowell *et al.*, 2008).

El estudio de los fósiles vivientes proporciona información valiosa sobre la evolución de adaptaciones específicas a las condiciones ambientales pasadas y actuales (Franks & Beerling, 2009). La evolución de las plantas ha estado regida por variaciones en las condiciones ambientales, caracterizada particularmente por altas y bajas concentraciones de carbono, las cuales determinan en gran parte la morfología

y fisiología foliar (Franks & Beerling, 2009; Carriquí *et al.*, 2015). Las especies de origen moderno (angiospermas), desarrolladas a bajas concentraciones de CO<sub>2</sub>, presentan en general, menor grosor de pared celular (T<sub>cw</sub>) y tamaño estomático (S), aunque mayor densidad (SD), posiblemente para alcanzar mayores tasas fotosintéticas (A<sub>N</sub>). Por el contrario, plantas originadas en ambientes con altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, presentan rasgos morfoanatómicos primitivos, caracterizados por valores más altos de masa seca de las hojas por unidad de área foliar (LMA), mayor área de superficie de cloroplastos expuesta al espacio aéreo intercelular (S<sub>c</sub>/S), mayor tamaño de cloroplastos (T<sub>chl</sub>), mayor grosor de T<sub>cw</sub>, estomas robustos y menor densidad de éstos en la lámina foliar (Franks & Beerling, 2009; Carriquí *et al.*, 2015; Veromann-Jürgenson *et al.*, 2017). Estos rasgos, encontrados por ejemplo, en varias gimnospermas evolutivamente antiguas, han sido relacionados con reducidas conductancias, tanto estomáticas (g<sub>s</sub>) como del mesófilo (g<sub>m</sub>) (limitantes difusivas), determinando una baja A<sub>N</sub> (Carriquí *et al.*, 2015; Veromann-Jürgenson *et al.*, 2017). Sin embargo, no solo las limitaciones difusivas son las responsables directas de las bajas A<sub>N</sub> registradas en especies primitivas. De tal modo, se han encontrado tendencias evolutivas de los parámetros cinéticos de Rubisco en base a las concentraciones atmosféricas de CO<sub>2</sub> (Galmés *et al.*, 2014; Iñiguez *et al.*, 2019). Así, especies evolutivamente más antiguas, presentan una menor afinidad de Rubisco por el dióxido de carbono (alto K<sub>c</sub>), menor factor de especificidad (S<sub>c/o</sub>) y su derivada disminución de la velocidad de carboxilación. Adicionalmente, la capacidad hidráulica de las hojas también ha sufrido variaciones, aumentando la densidad de las venas (D<sub>v</sub>) a lo largo de la filogenia, encontrando D<sub>v</sub> muy bajas en gimnospermas a muy altas en angiospermas (Brodribb & Feild, 2010). De este modo, estos rasgos han restringido o favorecido los rendimientos fotosintéticos de las especies. Así, los rasgos primitivos que limitan la fotosíntesis a concentraciones de CO<sub>2</sub> actuales podrían, ante un escenario de cambio climático, penalizar severamente el comportamiento de las plantas, pasando de una difusión limitada del CO<sub>2</sub> a un deterioro metabólico, y provocando potencialmente la muerte de la planta.

En la actualidad existe un escaso conocimiento de los procesos fisiológicos de *A. araucana*, específicamente, de aquellos asociados al metabolismo fotosintético y respuesta hidráulica frente a distintos patrones hídricos, con lo cual es difícil predecir los factores responsables de su condición sanitaria y sus posibles respuestas al

cambio climático, lo que resalta la necesidad de profundizar en su fisiología. En base a esto, en esta tesis se han desarrollado dos capítulos. En el primero, se presenta una revisión bibliográfica enfocada en la situación actual de las gimnospermas y sus respuestas, reportadas y propuestas, frente a cambio climático, abordando particularmente, aspectos relacionados a rasgos fotosintéticos e hidráulicos. En el segundo capítulo, se presentan los resultados de una caracterización anatómica y fisiológica de *A. araucana*, profundizando en los rasgos difusivos y bioquímicos asociados a asimilación de carbono. En este capítulo, se plantea como hipótesis que los rasgos morfofisiológicos evolutivamente antiguos de *Araucaria araucana* determinan bajas tasas fotosintéticas asociadas principalmente a limitaciones difusivas y son responsables de una baja capacidad de respuesta a restricción hídrica.



#### IV. CAPÍTULO I: MORTALIDAD ARBÓREA: VISIÓN GENERAL DEL EFECTO DEL CAMBIO CLIMÁTICO EN LAS GIMNOSPERMAS

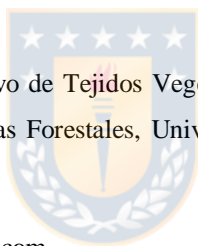
Betsy K. Rivera<sup>1\*</sup>, Jeroni Galmés<sup>2</sup>, Lohengrin A. Cavieres<sup>3,5</sup>, Eugenio Sanfuentes von Stowasser<sup>4</sup>, Patricia L. Sáez<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Cultivo de Tejidos Vegetales, Centro de Biotecnología, Departamento de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Concepción 4030000, Chile. <sup>2</sup>Research Group on Plant Biology under Mediterranean Conditions, INAGEA-Universitat de les Illes Balears, Balearic Islands 07122, Spain. <sup>3</sup>ECOBIOSIS, Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Barrio Universitario s/n, Concepción 4030000, Chile. <sup>4</sup>Laboratorio de Patología Forestal, Facultad Ciencias Forestales y Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. <sup>5</sup>Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB), Victoria 631, Barrio Universitario, Concepción, Chile.

**\*Autor correspondiente**

Betsy K. Rivera, Laboratorio Cultivo de Tejidos Vegetales, Centro de Biotecnología, Departamento de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Concepción 4030000, Chile.

E-mail: [betsyriverabriones7@gmail.com](mailto:betsyriverabriones7@gmail.com)



## RESUMEN

El rápido ritmo del cambio climático en las últimas décadas ha estado afectando distintos biomas forestales, evidenciado en el alto porcentaje de mortalidad de especies vegetales. La creación de modelos predictivos ha favorecido la comprensión, en parte, de los mecanismos subyacentes de esta mortalidad. Sin embargo, comprender cómo las especies evolutivamente antiguas han podido subsistir en la Tierra por millones de años, y qué respuestas tendrán frente al cambio climático ha sido poco abordado. En esta revisión, resumimos nuestra comprensión actual de la incidencia de mortalidad en los bosques de coníferas a nivel mundial y cómo la evolución de los rasgos morfofisiológicos primitivos pueden penalizar severamente la asimilación de carbono pasando de una difusión limitada del CO<sub>2</sub> a un deterioro metabólico, provocando potencialmente la muerte de la planta. En base a esto, encontramos una mayor concentración de estudios en el hemisferio norte, donde el cambio climático ha tenido mayor efecto en los bosques de coníferas. Sin embargo, el escaso estudio en el hemisferio sur limita la comprensión del efecto real del cambio climático sobre las familias más antiguas concentradas en esta región. Los rasgos primitivos de las gimnospermas pueden ser componentes importantes de la preservación de estas especies por millones de años, pero ante la eventual alteración de las condiciones ambientales hacia un clima más cálido y seco, estos rasgos pueden penalizar su supervivencia en un futuro próximo. *Araucaria araucana*, especie milenaria e icónica del hemisferio sur, ha sufrido los estragos del cambio climático, pero el escaso estudio de sus rasgos primitivos, nos ha limitado la comprensión real de su declive, con lo cual es difícil predecir los factores responsables de su condición sanitaria y sus posibles respuestas al cambio climático. Por tanto, conocer sus rasgos fisiológicos es un paso clave para entender su respuesta a la sequía y aumentar nuestro conocimiento sobre las posibles respuestas de otras especies ancestrales frente a esta amenaza.



## INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, como producto del cambio climático, se han reportado incrementos en la frecuencia e intensidad de las sequías, asociados a temperaturas más altas y cambios en los patrones de precipitaciones en diversas regiones boscosas (IPCC, 2021). En particular, se esperan incrementos de 3,3 °C a 5,7 °C para el 2100, lo que en consecuencia incrementaría las precipitaciones en las latitudes altas y en el Pacífico ecuatorial y las reduciría en las latitudes medias y regiones subtropicales (IPCC, 2014; 2017; 2021). Estas alteraciones climáticas potenciarían los eventos de mortalidad masiva de árboles, ya descritos en distintos biomas forestales, desde regiones semiáridas hasta bosques templados y tropicales (Choat *et al.*, 2012; Gaylord *et al.*, 2015). El fenómeno de mortalidad arbórea puede producir cambios significativos en la estructura y composición de los bosques, siendo esto último ya evidente en bosques de España, Suecia y Estados Unidos, donde se ha observado un reemplazo de especies dominantes de gimnospermas por especies de angiospermas (Rigling *et al.*, 2013; Navarro-Cerrillos *et al.*, 2014; Redmond *et al.*, 2015; Martínez-Vivalta & Lloret, 2016). Para dilucidar los mecanismos fisiológicos que conducen a la mortalidad de árboles se ha planteado un grupo de hipótesis ampliamente aceptadas: la inanición del carbono, fallo hidráulico y/o predisposición a ataques de patógenos (McDowell *et al.*, 2008, 2011).

La mortalidad de gimnospermas a nivel mundial ha sido foco central de muchos estudios, ya sea por su gran valor ecológico y económico, como por constituir uno de los grupos de plantas más antiguos del planeta (Wang & Ran, 2014). La distribución actual de las gimnospermas abarca todos los continentes, exceptuando algunas islas oceánicas y la Antártica, centrándose el 50% de las especies entre los trópicos (50° a 20° S y 60° a 20° N) y disminuyendo hacia latitudes ecuatoriales (Fragnière *et al.*, 2015). El grupo más diverso de gimnospermas, las coníferas, que constituye más del 39% de los bosques del mundo, crece actualmente entre los trópicos (Armenise *et al.*, 2012; Fragnière *et al.*, 2015) y una importante superficie de estos bosques se encuentra afectada por sequías, reportándose sus efectos en América del Norte, Europa occidental, Europa Central y Asia (Zhang *et al.*, 2017; Neumann *et al.*, 2017; Hlásny *et al.*, 2017; Kharuk *et al.*, 2015, 2021; Ganey *et al.*, 2021; Su *et al.*, 2021).

Aunque las gimnospermas son plantas evolutivamente antiguas, muchas de sus familias presentan edades de diversificación distintas (Wang & Ran, 2014). En el hemisferio norte, Pinaceae y Cupressaceae presentan edades más recientes que las familias Araucariaceae, Podocarpaceae y Callitroideae pertenecientes al hemisferio sur (Leslie *et al.*, 2012). Los cambios climáticos a lo largo del tiempo evolutivo pudieron haber favorecido el reemplazo de linajes antiguos por aquellos mejor adaptados a condiciones más frías y/o secas del Neógeno tardío, mientras que el hábitat templado y más húmedo en el hemisferio sur puede haber favorecido la supervivencia de linajes más antiguos (Moran *et al.*, 2006; Leslie *et al.*, 2012). Actualmente, el impacto de la sequía es especialmente relevante en el hemisferio norte en especies de Pinaceae y Cupressaceae. Sin embargo, en el hemisferio sur, la mortalidad de gimnospermas a causa de la sequía ha sido escasamente reportada (Suarez *et al.*, 2004; Amoroso *et al.*, 2012; Ramírez *et al.*, 2018). En estas especies, la variación en el control estomático ha sido utilizado como predictor de las causas fisiológicas de la mortalidad inducida por sequía (Zimmer *et al.*, 2016). En Pinaceae y algunas especies de Araucariaceae el mecanismo isohídrico induce el cierre de estomas mediante señales hormonales, mientras que en el otro extremo, el comportamiento anisohídrico registrado en especies de Cupressaceae y Taxaceae explica que los estomas se mantengan abiertos hasta umbrales hídricos muy negativos (ej. *Callitris* -8 MPa) (Brodrigg *et al.*, 2010). Aunque las plantas anisohídricas podrían correr un mayor riesgo de deshidratación, éstas generalmente presentan un sistema hidráulico mucho más resistente a la cavitación (Brodrigg *et al.*, 2014). La estructura hidráulica de las coníferas se caracteriza por un sistema conductor conformado exclusivamente de traqueidas, el cual, aunque menos eficiente en el transporte de agua comparado con las angiospermas, confiere mayor resistencia a márgenes de seguridad hidráulica del xilema más negativos (Choat, 2013). Aunque la mortalidad de las gimnospermas se produce generalmente a valores de  $P_{50}$  (perdida de la conductancia hidráulica del tallo en un 50%) muy negativos, las hojas son más susceptibles a las disfunciones hidráulicas, por tanto, es posible que la falla hidráulica de las hojas sea un factor de mortalidad más directo que la falla del tallo (Sack & Holbrook, 2006; Choat, 2013; Johnson *et al.*, 2016).

A pesar de las estrategias presentes en gimnospermas para resistir las altas tensiones negativas en el xilema, observaciones globales han demostrado que la falla del sistema hidráulico es el principal mecanismo asociado a la mortalidad

(McDowell *et al.*, 2008; Anderegg *et al.*, 2012; Adams *et al.*, 2017; Choat *et al.*, 2018; Schuldt *et al.*, 2020; Arend *et al.*, 2021). Por el contrario, el agotamiento de reservas de carbono como causal de muerte ha sido detectado solo en algunas coníferas (Mitchell *et al.*, 2013; Hendrik & Maxime, 2017). Sin embargo, Adams *et al.* (2017) encontraron que la mayoría de las gimnospermas estudiadas presentaron variaciones en el contenido de carbono en el momento de su muerte, sugiriendo que algunas especies mueren exclusivamente por falla hidráulica y otras, por falla hidráulica en combinación con reducción de carbohidratos no estructurales. Así, los mecanismos que conducen a la mortalidad de gimnospermas en condiciones de sequía son aún poco claros y su estudio es actualmente de gran relevancia debido al incremento en los eventos de mortalidad arbórea, especialmente en especies evolutivamente antiguas, cuya fisiología puede revelarnos importantes aspectos evolutivos. Así, el objetivo de este trabajo es presentar una revisión actualizada del efecto de la sequía producto del cambio climático, sobre los procesos fotosintéticos e hidráulicos de las gimnospermas y su posible relación con el fenómeno de mortalidad en estas especies.



### **1.1 Mortalidad arbórea y su relación con cambios en los patrones climáticos**

Los cambios en los patrones térmicos e hídricos podrían provocar alteraciones en nivel funcional en los árboles, conduciendo a un incremento en el nivel estrés y, por consiguiente, en el riesgo de mortalidad. De la Serrana *et al.* (2015), determinaron que, la causa de muerte en poblaciones de *Pinus halepensis* posterior a un episodio de sequía se asocia principalmente a la cavitación del xilema, ya que plantas aparentemente saludables y con evidentes síntomas de descomposición no presentaron diferencias significativas en el contenido de carbohidratos. En estas poblaciones, el factor biótico, ataque del escarabajo de la corteza, solo tuvo incidencia sobre individuos en descomposición, siendo este último considerado un comportamiento oportunista, lo que podría interpretarse como un factor de vulnerabilidad adicional en condiciones de estrés hídrico severo. De acuerdo a estudios realizados por Sevanto *et al.* (2014) en *Pinus edulis* sometidos a sequía, frente a eventos de mortalidad es posible distinguir distintas velocidades de muerte. La muerte rápida ocurriría por una reducción del potencial hídrico de las hojas, sin alteración en el contenido de carbohidratos no estructurales. Por el contrario, en el caso de muerte lenta, las plantas presentan un descenso pausado tanto del potencial

hídrico como del contenido de carbohidratos no estructurales. Si bien, la principal causa de muerte en *Pinus edulis* se puede atribuir a las altas tensiones negativas del xilema, el descenso rápido o lento del potencial hídrico podría estar influenciado por el contenido de carbohidratos que determina el tiempo de supervivencia en condiciones de estrés. En base a éstas y otras investigaciones, se han creado modelos predictivos de mortalidad arbórea, proponiendo distintas hipótesis asociadas principalmente a los eventos de sequía y sus efectos sobre los procesos fotosintéticos e hidráulicos (McDowell *et al.*, 2011). En la mayoría de las plantas, el cierre estomático es una respuesta temprana al estrés hídrico, esto puede impedir la entrada del CO<sub>2</sub> y conducir a una reducción en las tasas fotosintéticas (Lang & Wang, 2015). Sin embargo, el consumo respiratorio de carbohidratos almacenados continúa bajo esta condición, con el fin de mantener el requerimiento metabólico de la planta (Amthor, 2000). En consecuencia, el desbalance entre la baja producción de carbohidratos, por la disminución de la fotosíntesis, y el consumo de éstos por la respiración, puede desencadenar un déficit energético extremo en eventos prolongados de sequía, alterando tanto la movilización del carbono almacenado, como su transporte por el floema, los cuales afectan directamente los requerimientos metabólicos celulares. Este fenómeno, citado como la primera hipótesis de mortalidad arbórea, ha sido denominado “inanición de carbono” (McDowell *et al.*, 2008; Sala *et al.*, 2010; Klein *et al.*, 2011; Adams *et al.*, 2013; Mitchell *et al.*, 2013). Por el contrario, las plantas que mantienen los estomas abiertos bajo condiciones de sequía presentan una pérdida de agua por transpiración mayor que la absorbida por las raíces, lo que crea altas tensiones hídricas en el xilema, que pueden resultar en la formación de burbujas de aire y posterior cavitación, fenómeno denominado “fallo hidráulico” y que ha sido definido como la segunda hipótesis de mortalidad arbórea (Sperry *et al.*, 1998; McDowell *et al.*, 2008). Finalmente, alteraciones de los procesos fotosintéticos y/o hidráulicos pueden resultar en un debilitamiento en el metabolismo y defensa de los árboles, lo que incrementa la predisposición al ataque de patógenos, acelerando de esta forma la mortalidad arbórea (McDowell *et al.*, 2011).

## **1.2 Mortalidad arbórea en gimnospermas primitivas**

Las gimnospermas aparecieron hace unos 290 millones de años, dentro del período Pérmico (Haworth *et al.*, 2011a), alcanzando su mayor diversificación en la era

Mesozoica, particularmente en el Triásico y Jurásico caracterizados por un clima cálido y húmedo (Whiteside *et al.*, 2011; Bonis & Kürschner, 2012). La tasa de extinción de estas especies aumentó significativamente a lo largo del tiempo, particularmente desde el Cretácico medio, donde el rápido aumento de temperatura y aridificación coinciden con la expansión de las angiospermas (Willis & McElwain, 2014; O'Brien *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018). De este modo, un ambiente seco y árido fue letal para gimnospermas preexistentes, mientras que las angiospermas llegaron a dominar la mayoría de los ecosistemas terrestres (Hill & Brodribb, 1999; Feild *et al.*, 2011). Se ha sugerido que la baja concentración de CO<sub>2</sub> durante el Cretácico fue un factor importante en la radiación ecológica de las angiospermas, impulsando éstas innovaciones fisiológicas (McElwain *et al.*, 2005) que les permitieron mejorar la fotosíntesis y la absorción de agua frente a un clima seco y árido (Brodribb & Field, 2010). Así, un cambio abiótico similar al que actualmente ha provocado un alto índice de mortalidad, fue posiblemente uno de los factores causantes de la extinción masiva de gimnospermas durante el Cretácico medio (Allen *et al.*, 2010; Frangièrre *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018). Sin embargo, aún no existe un consenso sobre las causas principales del masivo declive de esas especies.

En la actualidad, las coníferas han disminuido significativamente su diversidad, contando solo con 615 especies distribuidas en seis familias (Farjon, 2010). En general, la deforestación, la tala indiscriminada y la mala gestión de los bosques las han convertido en uno de los grupos de plantas leñosas más amenazadas (Farjon, 2018), las que según predicciones regionales y globales, podrían ser las más afectadas en las próximas décadas producto del calentamiento global (McDowell *et al.*, 2016).

En Europa, eventos de sequía extrema ocurridos en el año 1994 en la Península Ibérica y, posteriormente, en los años 1998 y 2003 en Suiza e Italia produjeron la muerte de varias poblaciones de *Pinus sylvestris* y en el este de Escocia de la especie *Picea abies* (Martínez-Vilalta & Piñol, 2002; Dobbertin *et al.*, 2005). Asimismo, entre 1998 y 2009 se informó una gran mortalidad de *Picea abies* en Bielorrusia y parte sur de Rusia (Kharuk *et al.*, 2015) y en el 2018, mortalidad de *Picea abies*, *Picea alba* y *Pinus sylvestris* en los bosques templados de Alemania, Austria y Suiza (Schuldt *et al.*, 2020). En América del Norte, sequías registradas entre los años 2000 al 2007 y 2009-2011 causaron la mortalidad de especies como *Pinus edulis*, *Pinus contorta*, *Pinus monophylla*, *Pinus albicaulis*, *Juniperus*

*scopulorum* y *Abies spp.*, entre otras (Breshears *et al.*, 2005; Berg *et al.*, 2006; Voelker *et al.*, 2008; Allen *et al.*, 2010; Huang & Anderegg, 2012; Millar *et al.*, 2012; Moore *et al.*, 2016). Por otra parte, se han reportado eventos de mortalidad en especies de pinos y abetos en Asia (Zhang *et al.*, 2014a) y *Cedrus atlantica* en África. En América del Sur, se han reportado casos de mortalidad de *Austrocedrus chilensis* en bosques del norte de la Patagonia Argentina (Suarez *et al.*, 2004; Suarez & Kitzberger, 2008) y en Chile, en plantaciones exóticas de *Pino radiata* (Ramírez *et al.*, 2018) y recientemente, en *Araucaria araucana*. Si bien el daño observado en esta especie no ha sido reportado empíricamente como mortalidad producto de la sequía, los extensos períodos de la denominada “mega sequía” ocurrida entre los años 2010-2018, han dejado evidencia que el posible declive de *A. araucana* este asociado al cambio climático (Saavedra & Willhite, 2017; Vélez *et al.*, 2018, Garreaud *et al.*, 2020). En base a esto, Gipoulou (2017) encontró una estrecha relación entre el crecimiento y la mega sequía, donde la disminución de las precipitaciones se asoció a la disminución en el ancho de los anillos de crecimiento. Por otra parte, varios investigadores se han centrado en el estudio de los síntomas de la enfermedad asociada al ataque de patógenos (Balocchi *et al.*, 2021; Pastorino & Marchelli, 2021), las cuales han concluido que el agente patógeno estaría actuando como efecto secundario y que la principal causa de muerte de los árboles sería el cambio climático (Saavedra & Willhite, 2017; Vélez *et al.*, 2018; Balocchi *et al.*, 2021; Pastorino & Marchelli, 2021). Para establecer con seguridad dicha conclusión, es necesario conocer más a fondo los rasgos fisiológicos de las especies y sus respuestas a los factores inductores de cambio climático, información que en el caso de *A. araucaria*, hasta el día de hoy es desconocida.

### **1.3 Evolución de rasgos morfofisiológicos asociados a asimilación de carbono y posibles respuestas al fenómeno de mortalidad**

Se cree que, en parte, la abundancia de las plantas vasculares, se debe a su éxito frente a las diferentes condiciones atmosféricas presentes en el momento en que evolucionaron (McElwain *et al.*, 2005). En este sentido, especies originadas bajo concentraciones altas (helechos y gimnospermas) y bajas (angiospermas) de carbono atmosférico, adaptaron diferentes mecanismos anatómicos y fisiológicos de difusión, fijación de CO<sub>2</sub> y transporte de agua, lo que podría ayudar a explicar la menor capacidad fotosintética de helechos y gimnospermas y su mayor susceptibilidad ante

un ambiente más seco (Carriquí *et al.*, 2015; Brodribb & Buckley, 2018; Zhang *et al.*, 2018). Las plantas originadas en ambientes con altas concentraciones de carbono se caracterizan por presentar estomas de mayor tamaño y menor densidad, lo que determina conductancias estomáticas reducidas ( $g_s$ ) y menor control estomático. El control estomático ha sido reportado como un indicador importante de las respuestas estomáticas durante eventos de sequía. Movimientos estomáticos lentos pueden provocar una mayor pérdida de agua, inducir daños en el sistema hidráulico y desencadenar la muerte de la planta (McAdam *et al.*, 2016; Scoffoni & Sack 2017). En contraste, en un ambiente con menos sustrato para la fotosíntesis, las plantas compensaron la baja disponibilidad de  $CO_2$  incrementando la  $g_s$  al disminuir el tamaño de sus estomas (Franks & Beerling, 2009). El menor tamaño de los estomas se asocia a movimientos estomáticos rápidos ante variaciones ambientales, lo que permite mayor eficiencia en el uso del agua y seguridad hidráulica (Lawson & Blatt, 2014).

No solo las limitaciones estomáticas son las responsables directas de las bajas tasas fotosintéticas registradas principalmente en helechos y gimnospermas. Veromann-Jürgenson *et al.* (2017) y Carriquí *et al.* (2015) reportaron valores notablemente bajos en la conductancia del mesófilo ( $g_m$ ) de helechos y gimnospermas ( $0,074 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y de  $0,0103$  a  $0,124 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente), muy por debajo de los valores registrados en angiospermas ( $0,287 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Este componente es considerado uno de los mayores limitantes fotosintéticos dentro de los distintos grupos de plantas (Flexas *et al.*, 2008) y más aún, en distintas condiciones ambientales, pudiendo desencadenar un debilitamiento metabólico de las plantas (Flexas *et al.*, 2012a; Nadal & Flexas, 2018). Los valores de  $g_m$  están fuertemente determinados por las características estructurales de la hoja (Nobel, 1977; Flexas *et al.*, 2008). Así, se ha demostrado que la principal limitante para la difusión de  $CO_2$  desde las cavidades subestomáticas a los cloroplastos es la fase líquida, particularmente determinada por el grosor de la pared celular ( $T_{cw}$ ) y el área de superficie de los cloroplastos expuesta al espacio aéreo intercelular ( $S_c/S$ ) (Tomás *et al.*, 2013). En este sentido,  $T_{cw}$  ha ido disminuyendo y  $S_c/S$  aumentando a medida que se han ido diversificando las especies, lo cual se ha correlacionado con menores inversiones estructurales en densidad (LD) y grosor de las hojas (LMA). Las especies con alta LMA tienden a presentar una mayor inversión en tejido no fotosintético y un menor contenido de nitrógeno (N) por masa seca. Sin embargo, el contenido de



nitrógeno puede variar, registrándose un aumento debido a mayores inversiones en pared celular, junto con una menor inversión en proteínas fotosintéticas (Onoda *et al.*, 2017), lo que se refleja en menores tasas fotosintéticas en base a masa (Wright *et al.*, 2004; Hassiotou *et al.*, 2010; Donovan *et al.*, 2011).

Además de los rasgos estructurales que determinan  $g_m$  y por lo tanto  $A_N$ , algunos rasgos bioquímicos relacionados con Rubisco también han demostrado actuar como factores limitantes para la fotosíntesis. Al respecto, Galmés *et al.* (2014), reportaron tendencias evolutivas de los parámetros cinéticos de Rubisco en base a las concentraciones atmosféricas de  $CO_2$ . Especies evolutivamente más antiguas en condiciones de alta concentración de  $CO_2$  presentan una menor afinidad de Rubisco por el dióxido de carbono (alto  $K_c$ ) y menor factor de especificidad ( $S_{c/o}$ ). Esto sugiere que la evolución de  $g_m$ , la modificación de sus rasgos anatómicos y estructurales de las hojas y propiedades cinéticas de Rubisco pueden ser factores decisivos para la evolución hacia tasas fotosintéticas mayores (Carriquí *et al.*, 2015). Así, los rasgos primitivos que limitan la fotosíntesis de plantas evolutivamente antiguas, podrían, ante un escenario de cambio climático, penalizar severamente la performance de las plantas, pasando de una difusión limitada del  $CO_2$  a un deterioro metabólico, y provocando potencialmente la muerte de la planta.

#### 1.4 Evolución de rasgos hidráulicos

La estrecha relación entre la conductancia hidráulica y la fotosíntesis se ha considerado un aspecto fundamental en las plantas vasculares (Brodribb *et al.*, 2007; Brodribb *et al.*, 2013; Sack & Scoffoni, 2013; Baresch *et al.*, 2019) ya que la función principal de la nervadura de la hoja es suministrar agua para mantener los estomas abiertos y permitir el acceso del  $CO_2$  atmosférico (Zwieniecki & Boyce, 2014). La capacidad hidráulica de las hojas está determinada en gran medida por la arquitectura y anatomía de las venas, las cuales a lo largo de la filogenia han variado drásticamente entre las espermatofitas en respuesta a las concentraciones atmosféricas de  $CO_2$  (Brodribb *et al.*, 2007; Sack & Scoffoni, 2013). Las gimnospermas han mantenido durante 400 millones de años densidades de las venas ( $D_v$ ) prácticamente estables, con valores por debajo de los  $5 \text{ mm mm}^{-2}$ , mientras que las angiospermas del Cretácico temprano pasaron de poseer densidades de venas bajas a densidades de venas muy altas al final del Cretácico (Brodribb & Feild, 2010). Se cree que las bajas concentraciones de  $CO_2$  descritas al final del Cretácico



ejercieron presiones ambientales para aumentar la reticulación de las venas a causa del aumento del costo transpiratorio en un ambiente cálido y seco, modificación que permite a las angiospermas mantener altas tasas fotosintéticas (Brodribb & Feild, 2010; Feild *et al.*, 2011). Por lo tanto, antes de la caída del CO<sub>2</sub> atmosférico, las gimnospermas y las angiospermas basales poseían una menor  $D_v$  asociadas a células conductoras del xilema mucho más gruesas, como son las traqueidas y placas de perforación escalariformes, respectivamente (Feild & Brodribb, 2013). Por el contrario, en el Cretácico tardío, las placas de perforación simple fueron un prerrequisito para miniaturizar las venas dentro de la lámina foliar y así lograr una mayor  $D_v$  en las angiospermas modernas (Feild & Brodribb, 2013). De hecho, el triple aumento de la  $D_v$  en las angiospermas ha estado asociado al aumentado en la eficiencia hidráulica de las hojas ( $K_{leaf}$ ), encontrándose en distintas plantas vasculares una fuerte correlación positiva entre  $D_v$  y  $K_{leaf}$  (Brodribb *et al.*, 2007; Brodribb & Feild, 2010). Dado esto, se considera que la densidad de la nervadura de la hoja es la principal determinante anatómica de la conductancia hidráulica (Brodribb & Buckley, 2018). Sin embargo, la asociación entre la eficiencia del transporte de agua y la asimilación de carbono esta mediada por la estrecha relación entre las venas y los estomas (Brodribb & Jordan, 2011). Esta coordinación parece estar estrechamente ligada al tamaño de las células de las hojas, donde células epidérmicas pequeñas dan como resultado densidades de venas y estomas más altas (Carins Murphy *et al.*, 2016). Es así como se sugiere que las angiospermas al tener una alta capacidad de transporte de agua habrían sido capaces de mantener altas tasas fotosintéticas al momento de la caída de CO<sub>2</sub> atmosférico y logran su máxima expansión ecológica en el Cretácico medio, mientras que las gimnospermas experimentarían una severa penalización por difusión de carbono, reduciendo considerablemente su diversidad desde el Cretácico hasta el presente (Holoceno) (McElwain *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018).

### **1.5 Potencial riesgo de mortalidad asociado a lentas respuestas estomáticas: comparativa entre gimnospermas y angiospermas**

En las últimas décadas, el conocimiento de la influencia de los factores ambientales en el comportamiento estomático, centrados en las variaciones de luz, CO<sub>2</sub> y déficit de presión de vapor (VPD), se ha incrementado sustancialmente (Driesen *et al.*, 2020). La comprensión de las estrategias de respuesta de los estomas a las

variaciones ambientales puede dar indicios del potencial comportamiento de los estomas y estimar el tiempo diferencial hasta la mortalidad arbórea ante eventos de sequías asociados al cambio climático (Brodribb & McAdam, 2013; Duan *et al.*, 2015). Sin embargo, el control estomático y las relaciones evolutivas entre el tiempo de respuesta de los estomas y la conductancia estomática aún son en gran parte desconocidas en la mayoría de los linajes de plantas (Driesen *et al.*, 2020).

**1.5.1 Respuestas estomáticas a la luz.** Las plantas experimentan fluctuaciones diarias en la calidad e intensidad de la luz, lo que puede afectar la respuesta dinámica de los estomas (Matthews *et al.*, 2020). La apertura de los estomas es estimulada por dos vías diferentes, una responsable de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) o luz roja, y la otra vía dependiente de la luz azul (Shimazaki *et al.*, 2007). La luz roja impulsa la apertura de los estomas en respuesta a la baja concentración de CO<sub>2</sub> intercelular (C<sub>i</sub>) producto de la fotosíntesis. El bajo C<sub>i</sub> activa la proteína quinasa HT1 (High Leaf Temperature 1) que interactúa y fosforila las proteínas quinasas CBC1 y CBC2 (Convergence of Blue Light (BL) and CO<sub>2</sub> 1/2), las responsables de inhibir los canales de aniones tipo-S (Hiyama *et al.*, 2017). La activación de H<sup>+</sup>-ATPasa como la inactivación de los canales tipo-S pueden contribuir a la hiperpolarización de la membrana plasmática e impulsar la entrada de iones K<sup>+</sup> a las células de guarda y, por tanto, promover la apertura de los estomas (Hiyama *et al.*, 2017; Hosotani *et al.*, 2021). Por otro lado, la luz azul es percibida por los receptores fototropinas 1 y 2 en las células de guarda que inducen la fosforilación de la quinasa BLUS1 (Blue Light Signaling 1), y culmina en la activación de la célula de guarda H<sup>+</sup>-ATPasa, que hiperpolariza la membrana plasmática y, en consecuencia, aumenta la turgencia de las células de guarda (Kinoshita *et al.*, 2001; Takemiya *et al.*, 2013). Si bien las respuestas estomáticas a la PAR y luz azul se conservan en casi todas las plantas vasculares, existen especies, como los helechos polypodiopsida, que carecen de respuestas dependientes de la luz azul, probablemente como resultado de su evolución bajo dosel de plantas superiores (Schneider *et al.*, 2004). En las plantas, la adquisición de capacidad de respuesta a la luz azul se ha considerado un mecanismo importante al permitir mayor velocidad de apertura de los estomas, encontrando en angiospermas respuestas más rápidas a la luz azul que a la luz roja. Sin embargo, las gimnospermas a pesar de poseer respuesta a la luz azul, sus velocidades de respuesta

son muy inferiores a las angiospermas y la causa de esta lentitud aún se desconoce (Doi *et al.*, 2015).

**1.5.2 Respuestas estomáticas al CO<sub>2</sub>.** La detección de CO<sub>2</sub> es una propiedad intrínseca de las células de guarda que responden a la concentración de CO<sub>2</sub> intercelular (Mott, 1988). La apertura de los estomas inducida por CO<sub>2</sub> puede diferir en cierto grado entre las plantas vasculares, ya que los estomas se abren en respuesta a niveles bajos de CO<sub>2</sub> en las angiospermas en oscuridad, mientras que esta respuesta requiere luz en las gimnospermas (Brodribb & McAdam, 2013). Del mismo modo, existe una divergencia en el comportamiento fisiológico de los estomas entre estos grupos evolutivos en cuanto a la sensibilidad estomática al aumento de CO<sub>2</sub> (Brodribb *et al.*, 2009; Brodribb & McAdam, 2011). Las angiospermas presentan una mayor sensibilidad, cerrando rápidamente sus estomas frente a incrementos de CO<sub>2</sub>, en cambio, las gimnospermas no presentan respuestas notorias por encima de las concentraciones actuales (Brodribb & McAdam, 2013). Una explicación a este comportamiento diferencial es la activación de la señalización dependiente de calcio (Ca<sup>2+</sup>) en las angiospermas, al parecer ausente en linajes de plantas basales (Young *et al.*, 2006; Brodribb & McAdam, 2013; Ehonen *et al.*, 2019). Las proteínas de señalización críticas para esta vía son las proteínas CDPK (Calcium-Dependent Protein Kinases), que fosforilan los canales aniónicos que causan la despolarización de la membrana y el cierre de los estomas (Marten *et al.*, 2008). Por tanto, esta vía brinda beneficios adaptativos a las angiospermas en términos de uso altamente eficiente del agua, no obstante, la sensibilidad estomática al CO<sub>2</sub> elevado podría penalizar la asimilación de carbono ante el futuro incremento de CO<sub>2</sub> atmosférico (Brodribb *et al.*, 2009).

Aunque nuestra comprensión de los movimientos estomáticos al CO<sub>2</sub> atmosférico ha avanzado, los mecanismos de señalización que incluyen la percepción, transducción y expresión génica a altas concentraciones de CO<sub>2</sub> siguen siendo poco conocidos, y solo algunos estudios recientes en plantas modelo han aportado información acerca de los genes involucrados en el mecanismo del cierre estomático (Hiyama *et al.*, 2017; Sussmilch *et al.*, 2019; Driesen *et al.*, 2020; Hsu *et al.*, 2021; Ma & Bai, 2021). En los estomas, el CO<sub>2</sub> entra a las células de guarda a través de aquaporinas (PIP) y se convierte en bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) por la acción de las anhidrasas carbónicas (βCA). Luego, la acumulación de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> activa el gen

RHC (Resistant to High CO<sub>2</sub>) que reprime la actividad de HT1, una quinasa que regula negativamente el cierre de los estomas (Xue *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Hashimoto-Sugimoto *et al.*, 2016). HT1 activa OST1 (Open Stomata), un regulador positivo de los canales SLAC1 (Slow Anion Channel Associated 1), el cual fosforila los canales de anión SLAC1 provocando finalmente el cierre de los estomas a concentraciones elevadas de CO<sub>2</sub> (Hsu *et al.*, 2018). Si bien, se han caracterizado varios componentes de señalización en las angiospermas, se requieren más investigaciones para dilucidar la vía de señalización completa de los linajes basales.

**1.5.3 Respuestas estomáticas al déficit de presión de vapor.** La respuesta estomática es un medio clave por el cual las plantas vasculares ajustan la transpiración a los cambios diurnos de déficit de presión de vapor (VPD) (Berry *et al.*, 2010). Esta respuesta fue un paso importante en la evolución de las plantas, permitiendo controlar la pérdida de agua ante una atmosfera seca (Brodribb & McAdam, 2011). A pesar de que este comportamiento se ha investigado ampliamente en diferentes grupos de plantas, todavía no está claro el mecanismo de detección de VPD (Hsu *et al.*, 2021). Dentro de los hallazgos se ha descrito el modelo hidropasivo que vincula la turgencia de la hoja con la turgencia de las células de guarda y el modelo hidroactivo donde una disminución en la turgencia de la hoja desencadena la síntesis de la hormona ácido abscísico (ABA) (Bauer *et al.*, 2013; McAdam & Brodribb, 2015).

En las angiospermas existe evidencia sustancial que la respuesta de los estomas a VPD se produce a través de un rápido aumento de los niveles de ABA, asociado con una rápida regulación positiva del gen NCED que codifica la enzima 9- cis -epoxicarotenoide dioxigenasa, limitante de la velocidad en la vía de biosíntesis de ABA (Susmilch *et al.*, 2017). El aumento de ABA también explicaría la fuerte histéresis reportada en angiospermas durante la transición reversible de VPD, donde la tasa de apertura estomática al volver a VPD bajo es más lenta que la tasa de cierre a VPD alto, ya que los niveles de ABA disminuyen lentamente al regresar a un VPD reducido (McAdam & Brodribb, 2015). Por el contrario, en las gimnospermas la síntesis de ABA se produce a un ritmo mucho más lento, no alcanzando los niveles necesarios para desencadenar el cierre de los estomas, lo cual indicaría que los niveles de ABA no cambian durante las fluctuaciones diurnas de

VPD, respondiendo los estomas de manera hidropasiva (McAdam & Brodribb, 2015). La lenta síntesis de ABA en las gimnospermas se ha asociado presumiblemente a la falta de enzimas específicas o a un retraso en la velocidad de regulación positiva de los genes NCED en respuesta a los cambios de VPD (Hanada *et al.*, 2011; Brodribb & McAdam, 2017). Adicionalmente, investigaciones recientes han propuesto un modelo hipotético donde la proteína OST1 es necesaria para el cierre estomático a un alto VPD con la activación dependiente o independiente de ABA (Merilo *et al.*, 2018; Driesen *et al.*, 2020). Es así que, en términos evolutivos, las respuestas más ancestrales de los estomas a variaciones de VPD fueron gobernadas por la regulación hidropasiva e independiente de ABA, mientras que las respuestas activas probablemente evolucionaron en el lado de las angiospermas basales (McAdam & Brodribb, 2012, 2014, 2015; Martins *et al.*, 2016).

Finalmente, los rápidos movimientos estomáticos presentes en angiospermas probablemente le otorguen una mayor seguridad hidráulica frente a potenciales hídricos negativos, mientras que los movimientos lentos de las gimnospermas aumentan la presión del xilema ante eventos extremos de sequía, poniendo en riesgo la supervivencia de este grupo de plantas frente al cambio climático.

### **1.6 Respuestas fotosintéticas frente a sequía**

La sequía, propuesta como el principal detonante de eventos de mortalidad de bosques en muchas regiones del mundo (Allen *et al.*, 2010, 2015), induce cambios en diversos procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas (Chaves, 1991). Se ha descrito que plantas en condiciones de sequía modifican sus rasgos anatómicos, aumentando la densidad e índice estomático y disminuyendo el tamaño de los estomas (Quarrie & Jones, 1977; Yang & Wang, 2001; Pearce *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Xu & Zhou, 2008). En algunas especies, se ha descrito que esto conlleva menores valores de  $g_s$  ya que el menor tamaño estomático dificulta la difusión de  $CO_2$  en la hoja (Maherali *et al.*, 2002). Sin embargo, existen también especies tolerantes a la sequía que presentan menores densidades estomáticas (Quarrie & Jones, 1977; Silva *et al.*, 2009; Hamanishi *et al.*, 2012; Franks *et al.*, 2015; Ouyang *et al.*, 2017). En base a esto, es posible que las modificaciones que presentan las hojas en respuesta a la sequía no tengan un comportamiento único, y esta respuesta varíe entre especies dependiendo de la intensidad y frecuencia del tratamiento hídrico (Hamanishi *et al.*, 2012).

Si bien los primeros estudios sobre la respuesta de la fotosíntesis al estrés hídrico asumían que las limitaciones estomáticas y bioquímicas explicaban la disminución de la asimilación neta de CO<sub>2</sub> (Chaves, 1991), investigaciones posteriores demostraron que  $g_m$  también disminuye como respuesta a la escasez de agua (Flexas *et al.*, 2008). Rápidamente se confirmó que  $g_m$  es un componente dinámico y sensible incluso al estrés hídrico leve, y que las estructuras y las propiedades anatómicas de las células del mesófilo son determinantes importantes de  $g_m$  (Misson *et al.*, 2010). La modificación de la estructura y anatomía de la hoja, como un mayor grosor y ancho de pared, pueden ocurrir durante períodos de estrés hídrico (Ouyang *et al.*, 2017), incrementando la resistencia de la difusión del CO<sub>2</sub> en la fase líquida (Flexas *et al.*, 2012b; Tomás *et al.*, 2013). En este sentido, se ha descrito que  $T_{cw}$ , que representa más del 25% de la resistencia total del mesófilo (Tholen & Zhu, 2011) aumenta significativamente en condiciones de sequía, debido a un mayor engrosamiento de la pared celular (Ouyang *et al.*, 2017). Por el contrario,  $S_c/S$  tiende a disminuir en condiciones de escasez hídrica, lo que sumado a cambios en la densidad y LMA influyen negativamente en  $g_m$  (Han *et al.*, 2016).

Adicional a estos cambios asociados a  $g_s$  y  $g_m$ , se ha registrado un deterioro de la maquinaria fotosintética bajo estrés hídrico moderado a severo (Parry *et al.*, 2002; Galmés *et al.*, 2011). Grassi & Magnani (2005), identificaron que los componentes difusivos ( $g_s$  y  $g_m$ ) en *Quercus robur* y *Fraxinus oxyphylla*, fueron componentes principales en condiciones de estrés hídrico moderado. Sin embargo, las limitaciones bioquímicas (disminución en  $V_{cmax}$ ) fueron cuantitativamente importantes en condiciones de sequía severa. Esto último se puede atribuir a deterioros en la fosforilación y síntesis de ATP, inactivación de las enzimas del ciclo de Calvin, alteración en la regeneración de RuBP y en la actividad de Rubisco (Lawlor & Cornic, 2002; Bota *et al.*, 2004; Flexas *et al.*, 2004, Galmés *et al.*, 2007).

### **1.7 Efectos de la sequía en la conductividad hidráulica foliar**

La resistencia hidráulica foliar esta sustancialmente determinada por las resistencias en serie de las vías a través del xilema ( $K_x$ ) y de las trayectorias fuera del xilema o extraxilema ( $K_{ox}$ ) (Scoffoni *et al.*, 2017). La vía  $K_x$  está influenciada principalmente por los rasgos de las venas foliares, como la densidad, distancia, geometría y longitud de las venas, mientras que la vía  $K_{ox}$  es mucho más compleja, integrando ruta apoplástica a través de las paredes celulares, ruta simplástica mediante las

membranas celulares y la ruta transcelular cruzando los plasmodesmos (Nardini *et al.*, 2014; Buckley, 2015). Ante el decline de  $K_{\text{leaf}}$ , el mantenimiento del agua es casi imposible, atribuyendo el descenso de  $K_{\text{leaf}}$  a ambos componentes ( $K_x$  y  $K_{\text{ox}}$ ) (Scoffoni & Sack, 2017). A pesar de que se ha postulado la contribución equitativa de  $K_x$  y  $K_{\text{ox}}$  en el descenso de  $K_{\text{leaf}}$ , la vía  $K_{\text{ox}}$  se ha indicado como la principal impulsora de la vulnerabilidad hidráulica de las hojas en condiciones de deshidratación leve y moderada, mientras que  $K_x$  adquiere protagonismo bajo sequía severa (Bouche *et al.*, 2016; Trifiló *et al.*, 2016). De hecho, Charra-Vaskou *et al.* (2012) informaron que el descenso de  $K_{\text{leaf}}$  en *Pinus pinaster* se debió principalmente a cambios en las propiedades hidráulicas de  $K_{\text{ox}}$ , sugiriendo que el xilema de las venas es mucho más resistente a una alta tensión negativa inducida por sequía (Trifiló *et al.*, 2016). La embolia o cavitación del xilema de las venas determina el descenso de  $K_x$ , por el contrario, el declive de  $K_{\text{ox}}$  se relaciona a la pérdida de permeabilidad de los tejidos extraxilema causada por la contracción del mesófilo y de las células de la vaina del haz vascular, desactivación de las acuaporinas o colapso de las traqueidas de transfusión (Brodrribb & Holbrook, 2005; Shatil-Cohen *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014b). El tejido de transfusión es un tejido universal en las gimnospermas que incluye células parénquimáticas y traqueidas de transfusión. Las traqueidas de transfusión cumplen con el transporte de agua radial desde el xilema axial hacia la vaina del haz, además del almacenamiento de agua (Zhang *et al.*, 2014b). Estas traqueidas se caracterizan por un mayor tamaño y paredes celulares menos lignificadas que las traqueidas axiales, lo cual les confiere la capacidad de deformarse ante la deshidratación de las hojas, encontrando, por ejemplo, un colapso reversible en hojas de *Podocarpus* y *Taxus* ante disminuciones de  $K_{\text{leaf}}$  (Brodrribb & Holbrook, 2005; Zhang *et al.*, 2014b). Este mecanismo ha permitido a las coníferas experimentar potenciales hídricos de las hojas negativos y restáuralos posteriormente (Johnson *et al.*, 2016). Por lo tanto, el colapso de las traqueidas de transfusión podría ser un medio adaptativo para regular el potencial hídrico de las hojas en riesgo de embolia, funcionando tanto como un disyuntor y depósito para amortiguar el xilema durante el cierre de los estomas (Sack & Scoffoni, 2012). Sin embargo, el rol de las traqueidas de transfusión en respuesta a la vulnerabilidad hidráulica de la hoja aún no está completamente claro (Sack *et al.*, 2015).



### **1.8 *Araucaria araucana*: problemática sanitaria y su posible respuesta ante el cambio climático.**

La familia Araucariaceae es una de las más antiguas del mundo, con un amplio registro fósil de su extensa distribución en ambos hemisferios durante la era Mesozoica. En la actualidad, Araucariaceae está restringida geográficamente al hemisferio sur, con solo algunas especies vivas (Stockey, 1982; Setoguchi *et al.*, 1998) que habitan ambientes húmedos y principalmente mesotérmicos (Hill & Brodribb 1999; Kershaw & Wagstaff 2001). Entre las familias de coníferas, Araucariaceae es la más amenazada en territorios insulares, particularmente en Nueva Caledonia, y en América del Sur (Rumeu *et al.*, 2014). Se ha sugerido que Araucariaceae apareció a finales del Triásico y presentó su apogeo en el Jurásico, seguido de un declive continuo desde finales del Cretácico, que culmina con la extinción de varias especies de araucaria producto del incremento de la aridez (Miller, 1977; Kershaw & Wagstaff 2001; Panti *et al.*, 2012). Esta familia de coníferas está compuesta por tres géneros *Wollenia*, *Agathis* y *Araucaria*. Este último es el género más diversificado, con el registro fósil más extenso (Hill & Brodribb, 1999). Sobre la base de diferencias morfológicas y análisis filogenéticos moleculares, el género *Araucaria* se ha dividido en cuatro secciones; *Bunya* (1 spp.), *Intermedia* (1 spp.), *Eutacta* (15 spp.) y *Araucaria* (2 spp.) (Setoguchi *et al.*, 1998; Escapa & Catalano, 2013). Las dos especies de la sección *Araucaria* son: *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze y *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch, ambas endémicas de América del Sur (Dettmann & Clifford, 2005), que difieren de las otras secciones (*Bunya*, *Intermedia* y *Eutacta*) en el número de células subsidiarias (4-5), número de cromosomas (13), orientación de los estomas en las hojas maduras (paralela al eje de la hoja), disposición de los estomas en las hojas maduras (anfistomático), hábito (dioico), tipo de germinación (criptogeal), disposición del cono de polen (axilar), morfología del cono ovulífero (elipsoidal) y tipo de hoja (delgado y ancho), entre otros (Escapa & Catalano, 2013).

*A. araucana* es una de las coníferas más antiguas de América del Sur (Martín *et al.*, 2014), siendo considerada un fósil viviente (Aguilera-Betti *et al.*, 2017). Durante su apogeo en el período Jurásico, los niveles de CO<sub>2</sub> atmosférico estuvieron entre 900 y 1000 ppm, con un 27% de O<sub>2</sub> atmosférico (Kunzmann, 2007; Panti *et al.*, 2012; Steinhorsdottir & Vajda, 2015; Krause *et al.*, 2018).



En América del Sur, *A. araucana* está distribuida en Chile y Argentina. En Chile está ubicada en la Cordillera de los Andes, (37° 30'-39° 30 'S) y en la Cordillera de la Costa (37° 20'-38° 40 'S), en las regiones del Biobío, Araucanía y de Los Ríos, distribuida en 320,174 ha (Veblen, 1995). Actualmente, se encuentra catalogada en peligro de extinción para las poblaciones de la Cordillera de la Costa y vulnerable para la Cordillera de los Andes (IUCN, 1996; Rumeu *et al.*, 2014). Se ubica en altitudes aproximadas de 900-1700 m s.n.m en el sector andino y 850-1400 m s.n.m. en el sector costero (Veblen, 1995; Bekessy *et al.*, 2002; Martín *et al.*, 2014). Su hábitat se caracteriza por climas fríos en los sectores de mayor altitud (Cordillera de los Andes) y climas templados cálidos en los bosques de baja y media altitud (Cordillera de la Costa) (Donoso, 1993), donde la precipitación media anual fluctúa de 2.000-4.500 mm y de 1.000-1.500 mm, respectivamente (Ibarra *et al.*, 2010). En el sector andino, las temperaturas medias anuales varían entre 3,8 °C y 17 °C, mientras que en el sector costero, específicamente en la Cordillera de Nahuelbuta, las temperaturas medias oscilan entre 7,9 °C hasta 18 °C (Puchi *et al.*, 2021). Esta especie se desarrolla en suelos de origen volcánico formando bosques en mezcla con lenga (*Nothofagus pumilio*), ñirre (*N. antarctica*), coigüe (*N. dombeyi*), roble (*N. obliqua*) y, en menor proporción, raulí (*N. alpina*), con tendencia a formar bosques puros, especialmente en las zonas de mayor elevación (Donoso, 1981; Díaz-Vaz, 1984; Aagesen, 1998).

*A. araucana* adquirió características foliares que le permitieron adaptarse a estas condiciones ambientales. Esta especie presenta hojas perennes dispuestas en espiral sin pecíolos; son de forma lanceolada con un mucrón terminal. A nivel estructural, *A. araucana* se caracteriza por rasgos notablemente xerofíticos, como hojas coriáceas, alto contenido de ceras, hipodermis altamente lignificada, colénquima, lúmenes estrechos, alta LMA y una baja  $K_{leaf}$  (Lusk, 2001; Brodrigg *et al.*, 2005; Ojeda *et al.*, 2017). Sus estomas son tetracíticos, dispuestos a ambos lados de la superficie de la hoja, ubicados en filas paralelas y separados entre dos a cuatro filas de células epidérmicas a lo largo de la hoja (Barrera & Meza, 1991).

Actualmente se ha reportado un alto porcentaje de individuos de *A. araucana* con algún grado de deterioro en bosque adulto y en regeneración (CONAF, 2018). En bosques adultos esta condición ha tenido un aumento de un 93,3% a un 98%, con resultados fatales en un 11,3% de la población, según prospecciones realizadas entre 2016 y 2018 (CONAF, 2018). En árboles jóvenes (regeneración) menores a 1,3 m de

altura, el grado de afectación ha alcanzado un 86,5%, con un 15,4% de muerte. La enfermedad que afecta a los bosques de araucarias se caracteriza por presentar síntomas de necrosis en las hojas y ramas, avanzando desde la parte inferior a la superior de la corona, impulsada posiblemente por ataque de patógenos (Balocchi *et al.*, 2021). Dentro de los posibles supuestos, se encuentran las condiciones climáticas anormales producidas por el cambio climático, particularmente, por eventos de sequía (Easterling *et al.*, 2000, Vélez *et al.*, 2018; Pastorino & Marchelli, 2021). En abril de 2016, se informó el estado de algunos ejemplares de *A. araucana* en sectores cercanos a la Cordillera de Nahuelbuta y la Cordillera de los Andes, donde la mayor incidencia de individuos enfermos se presentó en las regiones costeras de menor disponibilidad hídrica, lo cual podría indicar que la mortalidad en árboles de *A. araucana* estaría atribuida a un deterioro metabólico (fotosintético y/o hidráulico) producto de la sequía.

De acuerdo a lo anterior y a los rasgos fisiológicos de especies antiguas y la historia evolutiva de las Araucariaceae (Franks & Beerling, 2009; Feild & Brodribb, 2013; Galmés *et al.*, 2014; Veromann-Jürgenson *et al.*, 2017; McAdam & Brodribb, 2015), se esperaría que *A. araucana* presente rasgos morfoanatómicos y cinéticos de Rubisco primitivos. Específicamente, una baja conductancia estomática asociada a estomas grandes y de menor densidad, y una lenta capacidad de respuesta de los estomas supondría una mayor susceptibilidad a variaciones ambientales. Sumado a una baja afinidad de la Rubisco por el CO<sub>2</sub> y un sistema de venas de menor densidad, podrían poner en riesgo la supervivencia de esta especie frente al cambio climático, convirtiéndola en un ejemplo más de mortalidad arbórea, perdiendo valiosa información evolutiva de los mecanismo de respuestas al estrés que le han permitido sobrevivir hasta el día de hoy.

Aparentemente, *A. araucana* no sería inmune a estos efectos y los casos de mortalidad detectados en sus poblaciones, principalmente adultos, coinciden con aquellos sectores donde se ha reducido la disponibilidad de agua. Sin embargo, para dilucidar el efecto real del cambio climático sobre *A. araucana*, quedan aún, muchas interrogantes por responder, algunas de ellas son propuestas en la Tabla 1. Por tanto, conocer sus rasgos fisiológicos es un paso clave para entender su respuesta a la sequía y aumentar nuestro conocimiento sobre las posibles respuestas de otras especies ancestrales frente a esta amenaza.

---

**Tabla 1** Algunas preguntas abiertas que se podrían abordar en futuras investigaciones relacionadas con los efectos del cambio climático sobre los procesos hidráulicos y fotosintéticos, y los rasgos que ha adquirido *A. araucana* a lo largo de la historia evolutiva.

---

¿Qué hipótesis de mortalidad arbórea se ajusta a esta especie?

¿Qué componente hidráulico limita a  $K_{leaf}$  ante estrés hídrico?

¿Qué componente fotosintético limita a *A. araucana*?

¿Qué rasgos presenta esta especie que le han permitido colonizar la tierra por millones de años?

¿Qué características primitivas estarían limitando su supervivencia frente a nuevos escenarios climáticos?

---

### 1.9 Observaciones finales

Más de un tercio de las especies de gimnospermas están al borde de la extinción, por lo cual, el efecto de la sequía sobre estas especies ha llamado la atención de investigadores que han canalizado sus esfuerzos en el estudio de su impacto. Los escasos estudios de distribución espacial y vulnerabilidad de las gimnospermas a la sequía a escala continental y mundial limitan la comprensión del efecto real del cambio climático sobre estas especies. Actualmente, la mayoría de los reportes se centran en el hemisferio norte, mientras que, en el hemisferio sur, donde se encuentra el reservorio de las familias más antiguas, ha sido poco abordado. Por tanto, futuros estudios sobre regiones más rezagadas permitirán aumentar la riqueza de datos para explorar posteriormente varios aspectos de procesos hidráulicos y fotosintéticos, especialmente en este antiguo grupo de plantas.

Dentro de los mecanismos que subyacen a la mortalidad arbórea, las hipótesis de falla hidráulica e inanición de carbono, requieren integrar aspectos más complejos, como son las propiedades hidráulicas de las hojas, consideradas el órgano distal que mayor restricción ejerce en el transporte de agua, e integrar sus componentes para determinar cuál de ellos es el principal determinante de la vulnerabilidad de la conductancia hidráulica foliar a la sequía.

Por otro lado, la reducción de la asimilación de carbono, y por ende la síntesis de carbohidratos no estructurales, es un efecto principal del déficit hídrico. Sin

embargo, el declive de la fotosíntesis integra componentes limitantes que se despliegan antes de concluir en la reducción de carbohidratos. El estrés hídrico dependiendo de su intensidad puede reducir la fotosíntesis a través del cierre de los estomas, reducción en la difusión de CO<sub>2</sub> en el mesófilo de la hoja o daño bioquímico en el proceso de fijación de CO<sub>2</sub>, por lo cual, abordar estas limitaciones fotosintéticas permitirá predecir y comprender en profundidad los rasgos fisiológicos adyacentes a la mortalidad por sequía.

La evidencia revisada aquí indica que los mecanismos que subyacen a las respuestas de las plantas al cambio climático, en general, no se conocen bien. Sin embargo, existe una creciente evidencia de que varios de los eventos globales de mortalidad de árboles son en parte producto de cambios en las condiciones ambientales.



## REFERENCIAS

- Aagesen DL.** 1998. On the northern fringe of the South American temperate forest: the history and conservation of the Monkey-Puzzle Tree. *Environmental History* 64-85.
- Adams HD, Germino MJ, Breshears DD, et al.** 2013. Nonstructural leaf carbohydrate dynamics of *Pinus edulis* during drought-induced tree mortality reveal role for carbon metabolism in mortality mechanism. *New Phytologist* 197, 1142-1151.
- Adams HD, Zeppel MJ, Anderegg WR, et al.** 2017. A multi-species synthesis of physiological mechanisms in drought-induced tree mortality. *Nature ecology & evolution* 1, 1285-1291.
- Aguilera-Betti I, Muñoz AA, Stahle D, et al.** 2017. The first millennium-age *Araucaria araucana* in Patagonia. *Tree-Ring Research* 73, 53-56.
- Allen CD, Breshears DD, McDowell NG.** 2015. On underestimation of global vulnerability to tree mortality and forest die-off from hotter drought in the Anthropocene. *Ecosphere* 6, 1-55.
- Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, et al.** 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management* 259, 660-684.
- Amoroso MM, Daniels LD, Larson BC.** 2012. Temporal patterns of radial growth in declining *Austrocedrus chilensis* forests in Northern Patagonia: the use of tree-rings as an indicator of forest decline. *Forest Ecology and Management* 265, 62-70.
- Amthor JS.** 2000. The McCree–de Wit–Penning de Vries–Thornley respiration paradigms: 30 years later. *Annals of botany* 86, 1-20.
- Anderegg WR, Berry JA, Smith DD, et al.** 2012. The roles of hydraulic and carbon stress in a widespread climate-induced forest die-off. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 233-237.
- Arend M, Link RM, Patthey R, et al.** 2021. Rapid hydraulic collapse as cause of drought-induced mortality in conifers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118.

- Armenise L, Simeone MC, Piredda R, et al.** 2012. Validation of DNA barcoding as an efficient tool for taxon identification and detection of species diversity in Italian conifers. *European Journal of Forest Research* 131, 1337-1353.
- Baresch A, Crifò C, Boyce CK.** 2019. Competition for epidermal space in the evolution of leaves with high physiological rates. *New Phytologist* 221, 628-639.
- Barrera E, Meza I.** 1991. Foliar epidermal characteristics of Chilean Gymnosperms. *Boletín Museo Nacional de Historia Natural* 42, 25-37.
- Bauer H, Ache P, Lautner S, et al.** 2013. The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis. *Current Biology* 23, 53-57.
- Bekessy SA, Allnutt TR, Premoli AC, et al.** 2002. Genetic variation in the vulnerable and endemic Monkey Puzzle tree, detected using RAPDs. *Heredity* 88, 243.
- Berg EE, Henry JD, Fastie CL, et al.** 2006. Spruce beetle outbreaks on the Kenai Peninsula, Alaska, and Kluane National Park and Reserve, Yukon Territory: relationship to summer temperatures and regional differences in disturbance regimes. *Forest Ecology and Management* 227, 219-232.
- Berry JA, Beerling DJ, Franks PJ.** 2010. Stomata: key players in the earth system, past and present. *Current opinion in plant biology* 13, 232-239.
- Bonis NR, Kürschner WM.** 2012. Vegetation history, diversity patterns, and climate change across the Triassic/Jurassic boundary. *Paleobiology* 38, 240-264.
- Bota J, Medrano H, Flexas J.** 2004. Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New phytologist* 162, 671-681.
- Bouche PS, Delzon S, Choat B, et al.** 2016. Are needles of *Pinus pinaster* more vulnerable to xylem embolism than branches? New insights from X-ray computed tomography. *Plant, cell & environment* 39, 860-870.
- Breshears DD, Cobb NS, Rich PM, et al.** 2005. Regional vegetation die-off in response to global-change-type drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 15144-15148.

- Brodrribb TJ, Bowman DJ, Nichols S, et al.** 2010. Xylem function and growth rate interact to determine recovery rates after exposure to extreme water deficit. *New Phytologist* 188, 533-542.
- Brodrribb TJ, Buckley TN.** 2018. Leaf Water Transport: A Core System in the Evolution and Physiology of Photosynthesis. In *The Leaf: A Platform for Performing Photosynthesis*. Springer, Cham.
- Brodrribb TJ, Feild TS, Jordan GJ.** 2007. Leaf maximum photosynthetic rate and venation are linked by hydraulics. *Plant physiology* 144, 1890-1898.
- Brodrribb TJ, Feild TS.** 2010. Leaf hydraulic evolution led a surge in leaf photosynthetic capacity during early angiosperm diversification. *Ecology letters* 13, 175-183.
- Brodrribb TJ, Holbrook NM, Zwieniecki MA, et al.** 2005. Leaf hydraulic capacity in ferns, conifers and angiosperms: impacts on photosynthetic maxima. *New Phytologist* 165, 839-846.
- Brodrribb TJ, Holbrook NM.** 2005. Water stress deforms tracheids peripheral to the leaf vein of a tropical conifer. *Plant Physiology* 137, 1139-1146.
- Brodrribb TJ, Jordan GJ, Carpenter RJ.** 2013. Unified changes in cell size permit coordinated leaf evolution. *New Phytologist* 199, 559-570.
- Brodrribb TJ, Jordan GJ.** 2011. Water supply and demand remain balanced during leaf acclimation of *Nothofagus cunninghamii* trees. *New Phytologist* 192, 437-448.
- Brodrribb TJ, McAdam SA, Jordan GJ, et al.** 2009. Evolution of stomatal responsiveness to CO<sub>2</sub> and optimization of water-use efficiency among land plants. *New Phytologist* 183, 839-847.
- Brodrribb TJ, McAdam SA, Jordan GJ, et al.** 2014. Conifer species adapt to low-rainfall climates by following one of two divergent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 14489-14493.
- Brodrribb TJ, McAdam SA.** 2011. Passive origins of stomatal control in vascular plants. *Science* 331, 582-585.
- Brodrribb TJ, McAdam SA.** 2013. Unique responsiveness of angiosperm stomata to elevated CO<sub>2</sub> explained by calcium signalling. *PLoS One* 8, e82057.
- Brodrribb TJ, McAdam SA.** 2017. Evolution of the stomatal regulation of plant water content. *Plant physiology* 174, 639-649.



- Buckley TN.** 2015. The contributions of apoplastic, symplastic and gas phase pathways for water transport outside the bundle sheath in leaves. *Plant, Cell & Environment* 38, 7-22.
- Carins Murphy MR, Jordan GJ, Brodribb TJ.** 2016. Cell expansion not cell differentiation predominantly co-ordinates veins and stomata within and among herbs and woody angiosperms grown under sun and shade. *Annals of Botany* 118, 1127-1138.
- Carriquí M, Cabrera HM, Conesab MÀ, et al.** 2015. Diffusional limitations explain the lower photosynthetic capacity of ferns as compared with angiosperms in a common garden study. *Plant, Cell & Environment* 38, 448-460.
- Charra-Vaskou K, Badel E, Burlett R, et al.** 2012. Hydraulic efficiency and safety of vascular and non-vascular components in *Pinus pinaster* leaves. *Tree physiology* 32, 1161-1170.
- Chaves MM.** 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of experimental Botany* 42, 1-16.
- Choat B, Brodribb TJ, Brodersen CR, et al.** 2018. Triggers of tree mortality under drought. *Nature* 558, 531-539.
- Choat B, Jansen S, Brodribb TJ, et al.** 2012. Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature* 491, 752-755.
- Choat B.** 2013. Predicting thresholds of drought-induced mortality in woody plant species. *Tree physiology* 33, 669-671.
- CONAF.** 2018. [www.conaf.cl/wp-content/uploads/2015/12/Da%C3%B1o-Foliar-Araucaria-P.-Parra.pdf](http://www.conaf.cl/wp-content/uploads/2015/12/Da%C3%B1o-Foliar-Araucaria-P.-Parra.pdf) Acceso Septiembre 2019.
- De la Serrana RG, Vilagrosa A, Alloza JA.** 2015. Pine mortality in southeast Spain after an extreme dry and warm year: interactions among drought stress, carbohydrates and bark beetle attack. *Trees* 29, 1791-1804.
- Dettmann ME, Clifford HT.** 2005. Biogeography of Araucariaceae. Australia and New Zealand forest histories: araucarian forests. *Australian Forest History Society Inc. Occasional Publication* 2, 1-9.
- Díaz-Vaz J.** 1984. *Araucaria araucana*, descripción anatómica. *Bosque* 5, 117-118.
- Dobbertin M, Mayer P, Wohlgemuth T, et al.** 2005. The decline of *Pinus sylvestris* L. forests in the Swiss Rhone valley-a result of drought stress? *Phyton Annales rei Botanicae Horn* 45, 153.



- Doi M, Kitagawa Y, Shimazaki KI.** 2015. Stomatal blue light response is present in early vascular plants. *Plant Physiology* 169, 1205-1213.
- Donoso C.** 1981. Tipos Forestales de los Bosques Nativos de Chile. Documento de Trabajo N° 38. Investigación y Desarrollo Forestal (CONAF/PNUD/FAO). FAO, Chile.
- Donoso C.** 1993. Bosques Templados de Chile y Argentina. Variación, estructura y dinámica. Primera Edición. Santiago, Chile. Editorial Universitaria.
- Donovan LA, Maherali H, Caruso CM, et al.** 2011. The evolution of the worldwide leaf economics spectrum. *Trends in Ecology & Evolution* 26, 88-95.
- Driesen E, Van den Ende W, De Proft M, et al.** 2020. Influence of environmental factors light, CO<sub>2</sub>, temperature, and relative humidity on stomatal opening and development: A review. *Agronomy* 10, 1975.
- Duan H, O'Grady AP, Duursma RA, et al.** 2015. Drought responses of two gymnosperm species with contrasting stomatal regulation strategies under elevated [CO<sub>2</sub>] and temperature. *Tree Physiology* 35, 756-770.
- Easterling DR, Meehl GA, Parmesan C, et al.** 2000 Climate extremes: observations, modeling, and impacts. *Science* 289, 2068-2074.
- Ehonen S, Yarmolinsky D, Kollist H, et al.** 2019. Reactive oxygen species, photosynthesis, and environment in the regulation of stomata. *Antioxidants & redox signaling* 30, 1220-1237.
- Escapa IH, Catalano SA.** 2013. Phylogenetic analysis of Araucariaceae: integrating molecules, morphology, and fossils. *International Journal of Plant Sciences* 174, 1153-1170.
- Farjon A.** 2010. *A Handbook of the World's Conifers (2 vols.)* (Vol. 1). Brill.
- Farjon A.** 2018. The Kew review: Conifers of the world. *Kew Bulletin*, 73, 1-16.
- Feild TS, Brodribb TJ, Iglesias A, et al.** 2011. Fossil evidence for Cretaceous escalation in angiosperm leaf vein evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 8363-8366.
- Feild TS, Brodribb TJ.** 2013. Hydraulic tuning of vein cell microstructure in the evolution of angiosperm venation networks. *New phytologist* 199, 720-726.
- Flexas J, Barbour MM, Brendel O, et al.** 2012b. Mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub>: an unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Science* 193, 70-84.

- Flexas J, Bota J, Loreto F, et al.** 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C<sub>3</sub> plants. *Plant biology* 6, 269-279.
- Flexas J, Loreto F, & Medrano H.** (Eds.). 2012a. *Terrestrial photosynthesis in a changing environment: a molecular, physiological, and ecological approach*. Cambridge University Press.
- Flexas J, Ribas-Carbo M, Diaz-Espejo A, et al.** 2008. Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>: current knowledge and future prospects. *Plant, cell & environment* 31, 602-621.
- Fragnière Y, Bétrisey S, Cardinaux L, et al.** 2015. Fighting their last stand? A global analysis of the distribution and conservation status of gymnosperms. *Journal of Biogeography* 42, 809-820.
- Franks PJ, Beerling DJ.** 2009. Maximum leaf conductance driven by CO<sub>2</sub> effects on stomatal size and density over geologic time. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 10343-10347.
- Franks PJ, Doheny-Adams TW, Britton-Harper ZJ, et al.** 2015. Increasing water-use efficiency directly through genetic manipulation of stomatal density. *New Phytologist* 207, 188-195.
- Galmés J, Conesa MA, Ochogavía JM, et al.** 2011. Physiological and morphological adaptations in relation to water use efficiency in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*. *Plant, Cell & Environment* 34, 245-260.
- Galmés J, Kapralov M, Andralojc P, et al.** 2014. Expanding knowledge of the Rubisco kinetics variability in plant species: environmental and evolutionary trends. *Plant, Cell & Environment* 37, 1989-2001.
- Galmés J, Medrano H, Flexas J.** 2007. Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. *New phytologist* 175, 81-93.
- Ganey JL, Iniguez JM, Vojta SC et al.** 2021. Twenty years of drought-mediated change in snag populations in mixed-conifer and ponderosa pine forests in Northern Arizona. *Forest Ecosystems* 8, 1-13.
- Garreaud RD, Boisier JP, Rondanelli R, et al.** 2020. The central Chile mega drought (2010–2018): a climate dynamics perspective. *International Journal of Climatology*, 40, 421-439.

- Gaylord ML, Kolb TE, McDowell NG.** 2015. Mechanisms of piñon pine mortality after severe drought: a retrospective study of mature trees. *Tree physiology* 35, 806-816.
- Gipoulou TJ.** 2017. Pérdida de vigorosidad de individuos de *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch por la megasequía del período 2010-2015. Tesis, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Grassi G, 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 & Environment* 28, 834-849.
- Hamanishi ET, Thomas BR, Campbell MM.** 2012. Drought induces alterations in the stomatal development program in *Populus*. *Journal of experimental botany* 63, 4959-4971.
- Han JM, Meng HF, Wang SY, et al.** 2016. Variability of mesophyll conductance and its relationship with water use efficiency in cotton leaves under drought pretreatment. *Journal of plant physiology* 194, 61-71.
- Hanada K, Hase T, Toyoda T, et al.** 2011. Origin and evolution of genes related to ABA metabolism and its signaling pathways. *Journal of plant research* 124, 455-465.
- Hashimoto-Sugimoto M, Negi J, Monda K, et al.** 2016. Dominant and recessive mutations in the Raf-like kinase HT1 gene completely disrupt stomatal responses to CO<sub>2</sub> in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* 67, 3251-3261.
- Hassiotou F, Renton M, Ludwig M, et al.** 2010. Photosynthesis at an extreme end of the leaf trait spectrum: how does it relate to high leaf dry mass per area and associated structural parameters? *Journal of Experimental Botany* 61, 3015-3028.
- Haworth M, Elliott-Kingston C, McElwain JC.** 2011a. Stomatal control as a driver of plant evolution. *Journal of Experimental Botany* 62, 2419-2423.
- Haworth M, Elliott-Kingston C, McElwain JC.** 2011b. The stomatal CO<sub>2</sub> proxy does not saturate at high atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations: evidence from stomatal index responses of *Araucariaceae* conifers. *Oecologia* 167, 11-19.
- Hendrik D, Maxime C.** 2017. Assessing drought-driven mortality trees with physiological process-based models. *Agricultural and forest meteorology* 232, 279-290.

- Hill RS, Brodribb TJ.** 1999. Turner Review No. 2-Southern conifers in time and space. *Australian Journal of Botany* 47, 639-696.
- Hiyama A, Takemiya A, Munemasa S, et al.** 2017. Blue light and CO<sub>2</sub> signals converge to regulate light-induced stomatal opening. *Nature communications* 8, 1-13.
- Hlásny T, Barka I, Kulla L, et al.** 2017. Sustainable forest management in a mountain region in the Central Western Carpathians, northeastern Slovakia: the role of climate change. *Regional environmental change* 17, 65-77.
- Hosotani S, Yamauchi S, Kobayashi H, et al.** 2021. A BLUS1 kinase signal and a decrease in intercellular CO<sub>2</sub> concentration are necessary for stomatal opening in response to blue light. *The Plant Cell* 33, 1813-1827.
- Hsu PK, Dubeaux G, Takahashi Y, et al.** 2021. Signaling mechanisms in abscisic acid-mediated stomatal closure. *The Plant Journal* 105, 307-321.
- Hsu PK, Takahashi Y, Munemasa S, et al.** 2018. Abscisic acid-independent stomatal CO<sub>2</sub> signal transduction pathway and convergence of CO<sub>2</sub> and ABA signaling downstream of OST1 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, E9971-E9980.
- Huang CY, Anderegg WR.** 2012. Large drought-induced aboveground live biomass losses in southern Rocky Mountain aspen forests. *Global Change Biology* 18, 1016-1027.
- Ibarra JT, Altamirano T, Gálvez N, et al.** 2010. Avifauna de los bosques templados de *Araucaria araucana* del sur de Chile. *Ecología austral* 20, 33-45.
- IPCC.** 2014. Pachauri R K, L A (eds). Meyer Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change IPCC. Geneva, Switzerland. 151.
- IPCC.** 2017. AR6 Scoping Meeting, Doc. 2. Addis Ababa, Ethiopia
- IPCC.** 2021. Summary for Policymakers. In: Masson-Delmotte V, Zhai P, Pirani A, Connors SL, Péan C, Berger S, Caud N, Chen Y, Goldfarb L, Gomis MI, Huang M, Leitzell K, Lonnoy E, Matthews JBR, Maycock TK, Waterfield T, Yelekçi O, Yu R, Zhou B, eds. Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of

the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press. In Press.

- IUCN.** 1996. World List of Threatened Trees. International Union for the Conservation of Nature. Gland, Switzerland, <http://www.iucn.org/themes/ssc/redlist/redlist.htm> URL. Acceso Septiembre 2019.
- Johnson DM, Wortemann R, McCulloh KA, et al.** 2016. A test of the hydraulic vulnerability segmentation hypothesis in angiosperm and conifer tree species. *Tree physiology* 36, 983-993.
- Kershaw P, Wagstaff B.** 2001. The southern conifer family *Araucariaceae*: history, status, and value for paleoenvironmental reconstruction. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32, 397-414.
- Kharuk VI, Im ST, Dvinskaya ML, et al.** 2015. Climate-induced mortality of spruce stands in Belarus. *Environmental Research Letters* 10, 125006.
- Kharuk VI, Im ST, Petrov IYA, et al.** 2021. Climate-driven conifer mortality in Siberia. *Global Ecology and Biogeography* 30, 543-556.
- Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, et al.** 2001. Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414, 656-660.
- Klein T, Cohen S, Yakir D.** 2011. Hydraulic adaptations underlying drought resistance of *Pinus halepensis*. *Tree Physiology* 31, 637-648.
- Krause AJ, Mills BJ, Zhang S, et al.** 2018. Stepwise oxygenation of the Paleozoic atmosphere. *Nature Communications* 9, 1-10.
- Kunzmann L.** 2007. Araucariaceae (Pinopsida): aspects in palaeobiogeography and palaeobiodiversity in the Mesozoic. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology* 246, 257-277.
- Lang Y, Wang M.** 2015. Effects of soil water on photosynthesis of *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl. in spring and summer. *Acta Ecologica Sinica* 35, 3043-3051.
- Lawlor DW, Cornic G.** 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, cell & environment* 25, 275-294.
- Lawson T, Blatt MR.** 2014. Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant physiology* 164, 1556-1570.

- Leslie AB, Beaulieu JM, Rai HS, et al.** 2012. Hemisphere-scale differences in conifer evolutionary dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 16217-16221.
- Lusk CH.** 2001. Leaf life spans of some conifers of the temperate forests of South America. *Revista Chilena de Historia Natural* 74, 711-718.
- Ma X, Bai L.** 2021. Elevated CO<sub>2</sub> and Reactive Oxygen Species in Stomatal Closure. *Plants* 10, 410.
- Maherali H, Reid CD, Polley HW, et al.** 2002. Stomatal acclimation over a subambient to elevated CO<sub>2</sub> gradient in a C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub> grassland. *Plant, Cell & Environment* 25, 557-566.
- Marten H, Hyun T, Gomi K, et al.** 2008. Silencing of NtMPK4 impairs CO<sub>2</sub>-induced stomatal closure, activation of anion channels and cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals in *Nicotiana tabacum* guard cells. *The Plant Journal* 55, 698-708.
- Martín MA, Mattioni C, Lusini I, et al.** 2014. New insights into the genetic structure of *Araucaria araucana* forests based on molecular and historic evidences. *Tree genetics & genomes* 10, 839-851.
- Martínez-Vilalta J, Lloret F.** 2016. Drought-induced vegetation shifts in terrestrial ecosystems: The key role of regeneration dynamics. *Global and Planetary Change* 144, 94-108.
- Martínez-Vilalta J, Piñol J.** 2002. Drought-induced mortality and hydraulic architecture in pine populations of the NE Iberian Peninsula. *Forest Ecology and Management* 161, 247-256.
- Martins SC, McAdam SA, Deans RM, et al.** 2016. Stomatal dynamics are limited by leaf hydraulics in ferns and conifers: results from simultaneous measurements of liquid and vapour fluxes in leaves. *Plant, cell & environment* 39, 694-705.
- Matthews JS, Violet-Chabrand S, Lawson T.** 2020. Role of blue and red light in stomatal dynamic behaviour. *Journal of Experimental Botany* 71, 2253-2269.
- McAdam SA, Brodribb TJ.** 2012. Fern and lycophyte guard cells do not respond to endogenous abscisic acid. *The Plant Cell* 24, 1510-1521.
- McAdam SA, Brodribb TJ.** 2015. The evolution of mechanisms driving the stomatal response to vapor pressure deficit. *Plant Physiology* 167, 833-843.



- McAdam SA, Susmilch FC, Brodribb TJ.** 2016. Stomatal responses to vapour pressure deficit are regulated by high speed gene expression in angiosperms. *Plant, cell & environment* 39, 485-491.
- McDowell NG, Beerling DJ, Breshears DD, et al.** 2011. The interdependence of mechanisms underlying climate-driven vegetation mortality. *Trends in Ecology & Evolution* 26, 523-532.
- McDowell NG, Pockman WT, Allen CD, et al.** 2008. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist* 178, 719-739.
- McDowell NG, Williams AP, Xu C, et al.** 2016. Multi-scale predictions of massive conifer mortality due to chronic temperature rise. *Nature Climate Change* 6, 295-300.
- McElwain JC, Willis KJ, Lupia R.** 2005. Cretaceous CO<sub>2</sub> decline and the radiation and diversification of angiosperms. A history of atmospheric CO<sub>2</sub> and its effects on plants, animals, and ecosystems. Springer, New York, NY.
- McElwain JC, Yiotis C, Lawson T.** 2016. Using modern plant trait relationships between observed and theoretical maximum stomatal conductance and vein density to examine patterns of plant macroevolution. *New Phytologist* 209, 94-103.
- Merilo E, Yarmolinsky D, Jalakas P, et al.** 2018. Stomatal VPD response: there is more to the story than ABA. *Plant Physiology* 176, 851-864.
- Millar CI, Westfall RD, Delany DL, et al.** 2012. Forest mortality in high-elevation whitebark pine (*Pinus albicaulis*) forests of eastern California, USA; influence of environmental context, bark beetles, climatic water deficit, and warming. *Canadian Journal of Forest Research* 42, 749-765.
- Miller CN.** 1977. Mesozoic conifers. *The Botanical Review* 43, 217-280.
- Misson L, Limousin JM, Rodriguez R, et al.** 2010. Leaf physiological responses to extreme droughts in Mediterranean *Quercus ilex* forest. *Plant, cell & environment* 33, 1898-1910.
- Mitchell PJ, O'Grady AP, Tissue DT, et al.** 2013. Drought response strategies define the relative contributions of hydraulic dysfunction and carbohydrate depletion during tree mortality. *New Phytologist* 197, 862-872.

- Moore GW, Edgar CB, Vogel JG, et al.** 2016. Mortalidad de árboles debido a una sequía excepcional que abarca desde ecorregiones méxicas hasta semiáridas. *Aplicaciones ecológicas* 26, 602-611.
- Moran K, Backman J, Brinkhuis H, et al.** 2006. The cenozoic palaeoenvironment of the arctic ocean. *Nature* 441, 601-605.
- Mott KA.** 1988. Do stomata respond to CO<sub>2</sub> concentrations other than intercellular? *Plant physiology* 86, 200-203.
- Nadal M, Flexas J.** 2018. Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> diffusion: effects of drought and opportunities for improvement. *Water scarcity and sustainable agriculture in semiarid environment*. Academic Press.
- Nardini A, Gullo MAL, Trifilò P, et al.** 2014. The challenge of the Mediterranean climate to plant hydraulics: responses and adaptations. *Environmental and Experimental Botany* 103, 68-79.
- Navarro-Cerrillo RM, Olave F, Moreno F, et al.** 2014. Stand structure and regeneration of harvested *Araucaria araucana*–*Nothofagus* stands in central Chile. *Southern Forests: a Journal of Forest Science* 76, 11-19.
- Neumann M, Mues V, Moreno A, et al.** 2017. Climate variability drives recent tree mortality in Europe. *Global change biology* 23, 4788-4797.
- Nobel PS.** 1977. Internal leaf area and cellular CO<sub>2</sub> resistance: photosynthetic implications of variations with growth conditions and plant species. *Physiologia Plantarum* 40, 137-144.
- O'Brien MJ, Engelbrecht BM, Joswig J, et al.** 2017. A synthesis of tree functional traits related to drought-induced mortality in forests across climatic zones. *Journal of Applied Ecology* 54, 1669-1686.
- Ojeda C, Espinosa L, Roig F.** 2017. Efectos del cambio climático en las hojas de *Araucaria araucana*. *Instituto Argentino de Nivología, Glaciología y Ciencias Ambientales*, Universitarios Potosinos.
- Onoda Y, Wright IJ, Evans JR, et al.** 2017. Physiological and structural tradeoffs underlying the leaf economics spectrum. *New Phytologist* 214, 1447-1463.
- Ouyang W, Struik PC, Yin X, et al.** 2017. Stomatal conductance, mesophyll conductance, and transpiration efficiency in relation to leaf anatomy in rice and wheat genotypes under drought. *Journal of experimental botany* 68, 5191-5205.



- Panti C, Pujana RR, Zamaloa MC, et al.** 2012. Araucariaceae macrofossil record from South America and Antarctica. *Alcheringa: An Australasian Journal of Palaeontology* 36, 1-22.
- Parry MA, Andralojc PJ, Khan S, et al.** 2002. Rubisco activity: effects of drought stress. *Annals of Botany* 89, 833-839.
- Pastorino MJ, Marchelli P.** 2021. *Low Intensity Breeding of Native Forest Trees in Argentina: Genetic Basis for Their Domestication and Conservation*. Springer.
- Pearce DW, Millard S, Bray DF, et al.** 2006. Stomatal characteristics of riparian poplar species in a semiarid environment. *Tree Physiology* 26, 211-218.
- Puchi PF, Camarero JJ, Battipaglia G, et al.** 2021. Retrospective analysis of wood anatomical traits and tree-ring isotopes suggests site-specific mechanisms triggering *Araucaria araucana* drought-induced dieback. *Global Change Biology* 27, 6394-6408.
- Quarrie SA, Jones HG.** 1977. Effect of abscisic acid and water stress on development and water stress of wheat. *Journal of Experimental Botany* 28, 192-203.
- Ramírez C, Álvarez M, San Martín C, et al.** 2018. El cambio climático como causa de daños en bosques chilenos. *Chloris Chilensis*. [www.chlorischile.cl](http://www.chlorischile.cl) Acceso Septiembre 2019.
- Redmond MD, Cobb NS, Clifford MJ, et al.** 2015. Woodland recovery following drought-induced tree mortality across an environmental stress gradient. *Global Change Biology* 21, 3685-3695.
- Rigling A, Bigler C, Eilmann B, et al.** 2013. Driving factors of a vegetation shift from Scots pine to pubescent oak in dry Alpine forests. *Global Change Biology* 19, 229-240.
- Rumeu B, Afonso V, Fernández-Palacios JM, et al.** 2014. Diversity, distribution and conservation status of island conifers: a global review. *Diversity and Distributions* 20, 272-283.
- Saavedra A, Willhite E.** 2017. Observations and Recommendations Regarding *Araucaria araucana* Branch and Foliage Mortality (Daño Foliar de la Araucaria) in the National Parks of South-Central Chile.
- Sack L, Holbrook NM.** 2006. Leaf hydraulics. *Annual Review of Plant Biology* 57, 361-381.

- Sack L, Scoffoni C, Johnson DM, et al.** 2015. The anatomical determinants of leaf hydraulic function. In *Functional and ecological xylem anatomy*. Springer, Cham.
- Sack L, Scoffoni C.** 2012. Measurement of leaf hydraulic conductance and stomatal conductance and their responses to irradiance and dehydration using the Evaporative Flux Method (EFM). *Journal of Visualized Experiments* e4179.
- Sack L, Scoffoni C.** 2013. Leaf venation: structure, function, development, evolution, ecology and applications in the past, present and future. *New phytologist* 198, 983-1000.
- Sala A, Piper F, Hoch G.** 2010. Physiological mechanisms of drought-induced tree mortality are far from being resolved. *New Phytologist* 186, 274-281.
- Schneider H, Schuettpelz E, Pryer KM, et al.** 2004. Ferns diversified in the shadow of angiosperms. *Nature* 428, 553-557.
- Schuldt B, Buras A, Arend M, et al.** 2020. A first assessment of the impact of the extreme 2018 summer drought on Central European forests. *Basic and Applied Ecology* 45, 86-103.
- Scoffoni C, Albuquerque C, Brodersen CR, et al.** 2017. Outside-xylem vulnerability, not xylem embolism, controls leaf hydraulic decline during dehydration. *Plant physiology* 173, 1197-1210.
- Scoffoni C, Sack L.** 2017. The causes and consequences of leaf hydraulic decline with dehydration. *Journal of Experimental Botany* 68, 4479-4496.
- Setoguchi H, Asakawa Osawa T, Pintaud JC, et al.** 1998. Phylogenetic relationships within Araucariaceae based on rbcL gene sequences. *American journal of botany* 85, 1507-1511.
- Sevanto S, McDowell NG, Dickman LT, et al.** 2014. How do trees die? A test of the hydraulic failure and carbon starvation hypotheses. *Plant, cell and environment* 37, 153-161.
- Shatil-Cohen A, Attia Z, Moshelion M.** 2011. Bundle-sheath cell regulation of xylem-mesophyll water transport via aquaporins under drought stress: a target of xylem-borne ABA? *The Plant Journal* 67, 72-80.
- Shimazaki KI, Doi M, Assmann SM, et al.** 2007. Light regulation of stomatal movement. *Annual Review of Plant Biology* 58, 219-247.

- Silva EC, Nogueira RJ, Vale FH, et al.** 2009. Stomatal changes induced by intermittent drought in four umbu tree genotypes. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 21, 33-42.
- Sperry JS, Adler FR, Campbell GS, et al.** 1998. Limitation of plant water use by rhizosphere and xylem conductance: results from a model. *Plant Cell and Environment* 21, 347-359.
- Steinhorsdottir M, Vajda V.** 2015. Early Jurassic (late Pliensbachian) CO<sub>2</sub> concentrations based on stomatal analysis of fossil conifer leaves from eastern Australia. *Gondwana Research* 27, 932-939.
- Stockey R.** 1982. The Araucariaceae: an evolutionary perspective. *Review of Palaeobotany and Palynology* 37, 133-154.
- Su J, Gou X, HilleRisLambers J, et al.** 2021. Increasing climate sensitivity of subtropical conifers along an aridity gradient. *Forest Ecology and Management* 482, 118841.
- Suarez ML, Ghermandi L, Kitzberger T.** 2004. Factors predisposing episodic drought-induced tree mortality in *Nothofagus*: site, climatic sensitivity and growth trends. *Journal of Ecology* 92, 954-966.
- Suarez ML, Kitzberger T.** 2008. Recruitment patterns following a severe drought: long-term compositional shifts in Patagonian forests. *Canadian Journal of Forest Research* 38, 3002-3010.
- Sussmilch FC, Brodribb TJ, McAdam SA.** 2017. Up-regulation of NCED3 and ABA biosynthesis occur within minutes of a decrease in leaf turgor but AHK1 is not required. *Journal of Experimental Botany* 68, 2913-2918.
- Sussmilch FC, Schultz J, Hedrich R, et al.** 2019. Acquiring control: the evolution of stomatal signalling pathways. *Trends in plant science* 24, 342-351.
- Takemiya A, Sugiyama N, Fujimoto H, et al.** 2013. Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening. *Nature communications* 4, 1-8.
- Tholen D, Zhu XG.** 2011. The mechanistic basis of internal conductance: a theoretical analysis of mesophyll cell photosynthesis and CO<sub>2</sub> diffusion. *Plant Physiology* 156, 90-105.
- Tian W, Hou C, Ren Z, et al.** 2015. A molecular pathway for CO<sub>2</sub> response in *Arabidopsis* guard cells. *Nature Communications* 6, 1-10.

- Tomás M, Flexas J, Copolovici L, et al.** 2013. Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub> across species: quantitative limitations and scaling up by models. *Journal of Experimental Botany* 64, 2269-2281.
- Trifiló P, Raimondo F, Savi T, et al.** 2016. The contribution of vascular and extra-vascular water pathways to drought-induced decline of leaf hydraulic conductance. *Journal of Experimental Botany* 67, 5029-5039.
- Veblen TT, Burns BR, Kitzberger T, et al.** 1995. The ecology of the conifers of southern South America. In N. J. Enright & R. S. Hill, eds. *Ecology of the Southern Conifers*, Melbourne University Press. 129-135.
- Vélez ML, Salgado Salomón ME, Marfetan A, et al.** 2018. *Caracterización desecación del dosel y sanidad de Araucaria araucana en Argentina*. Technical Report. Editor Javier Sanguinetti
- Veromann-Jürgenson LL, Tosens T, Laanisto L, et al.** 2017. Extremely thick cell walls and low mesophyll conductance: welcome to the world of ancient living! *Journal of Experimental Botany* 68, 1639-1653.
- Voelker SL, Muzika R, Guyette RP.** 2008. Individual tree and stand level influences on the growth, vigor, and decline of Red Oaks in the Ozarks. *Forest Science* 54, 8-20.
- Wang C, Hu H, Qin X, et al.** 2016. Reconstitution of CO<sub>2</sub> regulation of SLAC1 anion channel and function of CO<sub>2</sub>-permeable PIP2; 1 aquaporin as CARBONIC ANHYDRASE4 interactor. *The Plant Cell* 28, 568-582.
- Wang XQ, Ran JH.** 2014. Evolution and biogeography of gymnosperms. *Molecular phylogenetics and evolution* 75, 24-40.
- Whiteside JH, Grogan DS, Olsen PE, et al.** 2011. Climatically driven biogeographic provinces of Late Triassic tropical Pangea. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 8972-8977.
- Willis K, McElwain J.** 2014. *The evolution of plants*. Oxford University Press.
- Wright IJ, Groom PK, Lamont BB, et al.** 2004. Leaf trait relationships in Australian plant species. *Functional Plant Biology* 31, 551-558.
- Xu Z, Zhou G.** 2008. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *Journal of experimental botany* 59, 3317-3325.

- Xue S, Hu H, Ries A, et al.** 2011. Central functions of bicarbonate in S-type anion channel activation and OST1 protein kinase in CO<sub>2</sub> signal transduction in guard cell. *The EMBO journal* 30, 1645-1658.
- Yang HM, Wang GX.** 2001. Leaf stomatal densities and distribution in *Triticum aestivum* under drought and CO<sub>2</sub> enrichment, *Acta Phytoecologica Sinica* 25, 312-316.
- Young JJ, Mehta S, Israelsson M, et al.** 2006. CO<sub>2</sub> signaling in guard cells: calcium sensitivity response modulation, a Ca<sup>2+</sup>-independent phase, and CO<sub>2</sub> insensitivity of the *gca2* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 7506-7511.
- Zhang M, Dai S, Du B, et al.** 2018. Mid-Cretaceous hothouse climate and the expansion of early angiosperms. *Acta Geologica Sinica-English Edition* 92, 2004-2025.
- Zhang Q, Shao MA, Jia X, et al.** 2017. Relationship of climatic and forest factors to drought-and heat-induced tree mortality. *PLoS One* 12, e0169770.
- Zhang X, Lei Y, Pang Y, Liu X, & Wang J.** 2014a. Tree mortality in response to climate change induced drought across Beijing, China. *Climatic change* 124, 179-190.
- Zhang YJ, Rockwell FE, Wheeler JK, et al.** 2014b. Reversible deformation of transfusion tracheids in *Taxus baccata* is associated with a reversible decrease in leaf hydraulic conductance. *Plant Physiology* 165, 1557-1565.
- Zhang YP, Wang ZM, Wu YC, et al.** 2006. Stomatal characteristics of different green organs in wheat under different irrigation regimes, *Acta Agronomica Sinica* 32, 70-75.
- Zimmer HC, Brodribb TJ, Delzon S, et al.** 2016. Drought avoidance and vulnerability in the Australian Araucariaceae. *Tree physiology* 36, 218-228.
- Zwieniecki MA, Boyce CK.** 2014. Evolution of a unique anatomical precision in angiosperm leaf venation lifts constraints on vascular plant ecology. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281, 20132829.

V. CAPÍTULO II: ANATOMICAL AND BIOCHEMICAL EVOLUTIONARY ANCIENT TRAITS OF *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch AND THEIR EFFECTS ON CARBON ASSIMILATION\*

Betsy K. Rivera<sup>1\*</sup>, Patricia L. Sáez<sup>1,5\*</sup>, Lohengrin A. Cavieres<sup>2,5</sup>, Sebastià Capó-Bauçà<sup>3</sup>, Concepción Iñiguez<sup>3</sup>, Eugenio Sanfuentes von Stowasser<sup>4</sup>, Francisca Fuentes<sup>1</sup>, Constanza F. Ramírez<sup>1</sup>, Valentina Vallejos<sup>1</sup>, Jeroni Galmés<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Cultivo de Tejidos Vegetales, Centro de Biotecnología, Departamento de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Concepción 4030000, Chile; <sup>2</sup>ECOBIOISIS, Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Barrio Universitario s/n, Concepción 4030000, Chile; <sup>3</sup>Research Group on Plant Biology under Mediterranean Conditions, INAGEA-Universitat de les Illes Balears, Balearic Islands 07122, Spain; <sup>4</sup>Laboratorio de Patología Forestal, Facultad Ciencias Forestales y Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. <sup>5</sup>Institute of Ecology and Biodiversity (IEB), Concepción, Chile.



**\* Author for correspondence**

Betsy K. Rivera

Tel: +56990808852

Email: [betsyriverabriones7@gmail.com](mailto:betsyriverabriones7@gmail.com)

Patricia L. Sáez

Tel: +56942630599

Email: [patrisaez@udec.cl](mailto:patrisaez@udec.cl)

## ABSTRACT

The study of living fossils provides valuable information about the evolution of specific adaptations to past and current environmental conditions. *Araucaria araucana* is the oldest species in South America and one of the oldest genus in the world, despite this, there are few studies focused on its physiology and its responses to changes in environmental conditions. We performed an integrated approach aimed to characterize their stomatal, mesophyll and biochemical traits which govern its carbon assimilation under past and present levels of atmospheric CO<sub>2</sub>. Results indicated that *A. araucana* presents typical traits of ancient species, such as large stomata and low density, which trigger a low  $g_s$  and slow stomatal responsiveness to changing environmental conditions. However, interestingly, the quantitative analysis shows that  $A_N$  is equally limited by both diffusive and biochemical components. The Rubisco catalytic properties preserve ancient traits, probably because of the different environmental selective pressures during its diversification. The increase in the measurement temperature induced stomatal and biochemical limitations, which together with a lower Rubisco affinity for CO<sub>2</sub> can compromise their photosynthetic capacity in warmer conditions.

**KEYWORDS:** Ancient species, *Araucaria araucana*, leaf structural traits, mesophyll conductance, photosynthetic rates, rubisco kinetic, stomatal traits.

\*Este capítulo fue enviado como manuscrito a la revista *Tree Physiology*, y se encuentra actualmente aceptado con correcciones.



## INTRODUCTION

The earliest vascular plants diversified during the Silurian and Devonian periods of the Paleozoic (418-407 Mya) (Gensel, 2008). Gymnosperms appeared later, about 290 million years ago in the Permian period, while the most recent group, the angiosperms, originated 200 million years ago (Haworth *et al.*, 2011a), where each plant group was ruled by different atmospheric conditions. The species which originated under high (ferns and gymnosperms), and low (angiosperms) atmospheric carbon concentrations deploy different anatomical and physiological mechanisms related to CO<sub>2</sub> diffusion and fixation (Franks & Beerling, 2009; Flexas & Carricú, 2020). In this sense, ferns and gymnosperms present a lower photosynthetic capacity as compared to angiosperms (Carricú *et al.*, 2015). In an environment with low CO<sub>2</sub>, plants compensate by increasing stomatal density and decreasing stomatal size, which results in greater stomatal conductance ( $g_s$ ), and therefore higher photosynthetic rates ( $A_N$ ) (Franks & Beerling, 2009).

It is important to highlight that not only stomatal limitations are directly responsible for the low  $A_N$  found in gymnosperms. Carricú *et al.* (2015) and Veromann-Jürgenson *et al.* (2017) reported remarkably lower values of mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> ( $g_m$ ) in gymnosperms than in angiosperms. Low  $g_m$  can be attributed to leaf structural traits, particularly to the cell wall thickness ( $T_{cw}$ ) and the chloroplast surface area exposed to intercellular airspace ( $S_c/S$ ) (Tomás *et al.*, 2013).  $T_{cw}$  has been decreasing, while  $S_c/S$  has been increasing as species have diversified, and both parameters have been correlated with lower structural investments in leaf density (LD) and leaf mass area (LMA) (Gago *et al.*, 2019). Species with high LMA tend to have a higher investment in non-photosynthetic tissue and a lower nitrogen (N) content per dry mass. However, a positive correlation has also been found between LMA and the fraction of N assigned to cell walls to the detriment of photosynthetic proteins (Onoda *et al.*, 2017), which is reflected in lower  $A_N$  mass-based (Wright *et al.*, 2004).

In addition to the structural traits determining  $g_m$  and, therefore,  $A_N$ , some biochemical traits related to Rubisco have also proven to act as limiting factors for photosynthesis. Galmés *et al.* (2014) reported evolutionary trends of Rubisco kinetic parameters based on atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations. Evolutionarily older species that developed under high atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations have a lower Rubisco



affinity for CO<sub>2</sub> (high K<sub>c</sub>) and a lower specificity factor (S<sub>c/o</sub>), resulting in a decreased carboxylation turnover rate (K<sub>cat</sub><sup>c</sup>). Taken together, this evidence suggests that factors governing CO<sub>2</sub> diffusion from the atmosphere to the sites of carboxylation, leaf anatomical and structural leaf traits, and the kinetic properties of Rubisco play a decisive role in the evolution of plant species towards higher A<sub>N</sub>.

Araucariaceae has an extremely broad fossil record, indicative of an extensive distribution in both the Northern and Southern Hemispheres in the Mesozoic. At present, however, Araucariaceae is geographically restricted to the Southern Hemisphere, with a few living species (Stockey, 1982; Setoguchi *et al.*, 1998). It has been suggested that Araucariaceae appeared in the late Triassic and presented their apogee in the Jurassic, followed by a continued decline since the end of the Cretaceous (Miller, 1977; Panti *et al.*, 2012). This conifer family is composed of three genera *Wollemia*, *Agathis* and *Araucaria*. The latter is the most diversified genus, with the most extensive fossil record (Hill & Brodribb, 1999). Based on morphological differences and molecular phylogenetic analyses, the *Araucaria* genus has been divided into four sections; *Bunya* (1 spp.), *Intermedia* (1 spp.), *Eutacta* (15 spp.) and *Araucaria* (2 spp.) (Setoguchi *et al.*, 1998; Escapa & Catalano, 2013). The two species in the *Araucaria* section are: *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze and *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch, both endemic to South America (Dettmann & Clifford, 2005), which differ from the other sections (*Bunya*, *Intermedia* and *Eutacta*) in the number of subsidiary cells (4-5), chromosome number (13), stomata orientation on mature leaves (parallel to leaf axis), stomata disposition on mature leaves (amphistomatic), habit (dioecious), germination type (cryptogean), pollen cone disposition (axillary), ovuliferous cone morphology (ellipsoidal) and leaf type (thin and broad), among others (Escapa & Catalano, 2013).

*A. araucana* is the oldest conifer in South America (Martín *et al.*, 2014), with individuals reaching 1000 years old, being considered a living fossil (Aguilera-Betti *et al.*, 2017). During their apogee in the Jurassic period, the atmospheric CO<sub>2</sub> levels were between 900 and 1000 ppm, with 27% of atmospheric O<sub>2</sub> (Kunzmann, 2007; Panti *et al.*, 2012; Steinthorsdottir & Vajda, 2015; Krause *et al.*, 2018). *A. araucana* acquired thus foliar characteristics that allowed it to adapt to these environmental conditions. This species presents evergreen leaves that are arranged in a spiral without petioles; they are lanceolate in shape with a terminal mucron. At the structural level, *A. araucana* is characterized by notably xerophytic traits, such as

leathery leaves, a high wax content, a highly lignified hypodermis, collenchyma and high LMA (Lusk, 2001; Brodribb *et al.*, 2005; Ojeda *et al.*, 2017). Their stomata are tetracytic, arranged on both sides of the leaf surface, located in parallel rows, and separated between two to four other rows of epidermal cells along the leaf (Barrera & Meza, 1991). Despite the valuable information that living fossils provide, including all the adaptations and adjustments that this species has had to evoke to maintain its existence on Earth for millions of years, studies regarding the leaf anatomy and structure of *A. araucana* are conspicuously limited (Barrera & Meza, 1991; Lusk, 2001; Brodribb *et al.*, 2005; Ojeda *et al.*, 2017), and those regarding its physiology are almost null. Based on this, we have carried out an anatomical and physiological characterization of *A. araucana* (araucaria), delving into the diffusive and biochemical traits that determine its carbon assimilation. We hypothesized that evolutionarily ancient leaf morphophysiological and Rubisco catalytic traits of *A. araucana* restrict its carbon assimilation under the present levels of atmospheric CO<sub>2</sub>.



## MATERIALS AND METHODS

### 1.1 Plant material and experimental conditions

*A. araucana* seeds were collected from the Malalcahuello sector, Araucania Region, and grown in the Los Quillayes nursery, in Quillón county, Chile. Twelve plants were studied when they were fifteen years old and had, on average, a height of  $71.8 \pm 2.7$  cm,  $2.7 \pm 0.1$  cm collar diameter and  $3.7 \pm 0.3$  whorls. Plants were grown in 39 cm tall plastic pots, with approximately 60% of the original volcanic soil substrate and 40% potting soil, which included organic matter and bark residue and treated chips (ANASAC). Plants were fertilized one month before starting the measurements, with NPKCaMg at 1:2:2:2:1 w/w and irrigated each time with approximately  $9 \pm 0.1$  L twice a week throughout the study. The study was carried out in a nursery of the University of Concepción, where the air temperature was recorded every 30 min with a HOBO® U-30 microclimatic station in autumn, between January and June 2019 (Onset Computer Co, Bourne, MA, USA) (Table S1).

## 1.2 Stomatal traits and the theoretical maximum stomatal conductance

The anatomical characteristics of the stomata were determined in the middle leaf section on both the adaxial and abaxial faces. The leaves were collected from branches located in the middle portion of the trees and immediately fixed in FAA (formalin-glacial acetic acid-70% alcohol). Afterwards, plant material was boiled in 96% ethanol for 10 min and subsequently boiled again in an aqueous solution (1:1) of 96% ethanol and 5% sodium hydroxide for 10 min. The material was washed twice with distilled water, then a 50% sodium hypochlorite solution was applied and allowed to stand for 1 to 4 h until the leaves became transparent. Once the material was rinsed, it was washed five times with distilled water and kept in a 5% chloral hydrate solution for 10 min. Subsequently, the adaxial and abaxial epidermis were separated using a cutting blade. For staining, a 20% solution of safranin in 96% ethanol was applied for 5 min, and 50% glycerin was applied for mounting the sample (De Strittmatter, 1973). Samples were photographed with an optical microscope (CX31, Olympus, Japan) and micrographs were measured using the ImageJ software (Wayne Rasband / NIH, Bethesda, MD, EE. UU.). The stomatal size ( $S$ ,  $\mu\text{m}^2$ ) was calculated as the length of the guard cell ( $GL$ ,  $\mu\text{m}$ ) and multiplied by the width ( $SW$ ,  $\mu\text{m}$ ) of the guard cell pair. The length itself was estimated by calculating the average of 25 pairs of guard cells chosen randomly from five leaves (5 measurements per leaf) (Hasper *et al.*, 2017). Stomatal density ( $SD$ ) was determined by counting the number of stomata per unit of epidermal area (Franks & Beerling, 2009; Hasper *et al.*, 2017). The stomatal area index was obtained by taking the product from  $SD$  and  $S$  according to Galmés *et al.* (2013). To determine the theoretical maximum stomatal conductance ( $g_{w\text{max}}$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), the Franks & Farquhar (2001) and Dow *et al.* (2014) methods were used. Thus,  $g_{w\text{max}}$  was calculated as:  $g_{w\text{max}} = d/v SD \alpha_{\text{max}} / (\text{PD} + \pi/2 \cdot \sqrt{\alpha_{\text{max}}/\pi})$ , where  $d$  is the water vapor diffusivity in the air ( $2.41 \times 10^{-5} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) and  $v$  is the molar volume of air ( $23.23 \times 10^{-3} \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1}$ ) at  $10^\circ\text{C}$  (Montgomery, 1947),  $SD$  is the stomatal density per  $\text{mm}^{-2}$ ,  $\pi$  is the mathematical constant (3.142),  $\alpha_{\text{max}}$  is the maximum area of the open stomatal pore ( $\mu\text{m}^2$ ), calculated as  $\beta (\pi \cdot \text{PL}^2/4)$ , where  $\beta$  is a geometric constant that indicates the circular fraction of a pore with a diameter equal to the length of the pore ( $\text{PL}$ ,  $\mu\text{m}$ ) and in the case of gymnosperms the stomata can only open up to approximately 50% of the full circle, using in this analysis  $\beta = 0.5$  according to Franks *et al.* (2014). The depth of the stomatal pore ( $\text{PD}$ ,  $\mu\text{m}$ ) was calculated for fully open stomata as  $SW/2$

assuming that guard cells expand to a circular cross section (Franks & Beerling, 2009).

### 1.3 Gas exchange measurements

The leaf gas exchange was determined simultaneously with the chlorophyll *a* fluorescence measurement using an open gas exchange system Li-6400 (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) with an integrated fluorescence chamber (Li-6400-40; LI-COR Inc.). Leaves were randomly selected from the middle section of each tree. When leaves did not completely cover the infrared gas analyzer chamber, a correction was made for the actual area of the leaf, using ImageJ software (Wayne Rasband / NIH, Bethesda, MD, EE. UU.). To achieve this correction, the leaf was kept in the leaf chamber fluorometer, and then carefully open for not to move the leaf. Area foam pads 2 cm<sup>2</sup> were glued to the leaf, preserving the original measurement position and it was photographed for the actual area of measurement be obtained.

The response of the net photosynthesis CO<sub>2</sub> uptake ( $A_N$ ) to varying light intensities was assessed with light response curves, which were measured between 11 a.m. and 3 p.m. approximately. Light was gradually decreased from 2000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  to 0  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , with measurements taken at 10 different light intensities, after a steady state of 30 to 35 min (until  $A_N$  and stomatal conductance,  $g_s$ , stabilized to the new environmental condition inside the leaf cuvette) at each light intensity. The chamber was programmed at a leaf temperature of 20 °C, CO<sub>2</sub> concentration ( $C_a$ ) 400  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  air, air humidity of 40-60%, 250  $\mu\text{mol s}^{-1}$  of flow and was maintained during the measurements a VPD of  $1.32 \pm 0.02$  kPa. The curves were analyzed by fitting a non-rectangular hyperbola, according to the equation:  $A_N = ((\phi I + A_{\max}) - ((\phi I + A_{\max})^2 - 4\theta\phi I A_{\max})^{0.5}/2\theta) - R_{\text{dark}}$ , where  $A_{\max}$  is the light saturated rate of CO<sub>2</sub> assimilation at infinitely high irradiance,  $\phi$  is the (apparent) quantum yield,  $I$  is the absorbed irradiance,  $\theta$  is the curvature factor and  $R_{\text{dark}}$  is the dark respiration (Lambers *et al.*, 2008). The light compensation point was obtained as  $I_{\text{comp}}: (R_{\text{dark}} (\theta R_{\text{dark}} - A_{\max})) / (\phi (R_{\text{dark}} - A_{\max}))$ , according to Lobo *et al.* (2013).

To assess  $A_N$ -leaf temperature response curves, leaf cuvette conditions were set to 400  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  air, light-saturating of 2000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , 40-60% humidity and 250  $\mu\text{mol s}^{-1}$  of flow. The leaf temperature inside the cuvette was

initially set to 10 °C, and after a stabilization period of 30 to 40 min,  $A_N$  was recorded. Then, the leaf temperature was increased in regular intervals of 5 °C, preserving the stabilization times between temperatures, until reaching a maximum of 30 °C, with  $A_N$  was recorded at the 5 different leaf temperatures.

To obtain the temperature at which  $A_N$  reached its maximum value (optimal temperature,  $T_{opt}$ ), each set of measurements was fitted to a second order polynomial function, following the equation:  $A_N = aT_{leaf}^2 + bT_{leaf} + c$  (Kroner & Way, 2016).

The response of  $A_N$  to varying substomatal  $CO_2$  concentrations ( $C_i$ ) was studied with  $A_N-C_i$  curves for two temperatures. The curves were initiated by allowing the leaf to reach a steady state of net photosynthesis ( $A_N$ ) and  $g_s$  (for this species, typically 30 to 35 min after clamping the leaf). Measurements in the leaf chamber were performed at  $C_a$  of 400  $\mu mol CO_2 mol^{-1}$  air, saturating light intensity (2000  $\mu mol photons m^{-2} s^{-1}$ ), flow rate of 250  $\mu mol s^{-1}$ , air relative humidity of 40-50% and VPD of  $1.31 \pm 0.02$  and  $1.88 \pm 0.03$  kPa for the leaf temperature of 20 °C and 25 °C, respectively.

Thereafter,  $C_a$  was lowered to 0  $\mu mol CO_2$ , following increases up to a maximum of 2000  $\mu mol CO_2 mol^{-1}$ . In total,  $A_N-C_i$  curves allowed for 11 measurements at different  $C_a$ . At each  $C_a$ , measurements were taken after maintaining the leaf for at least 30 min at the corresponding  $CO_2$  concentration. Dark mitochondrial leaf respiration ( $R_{dark}$ ) was observed at pre-dawn at a  $C_a$  of 400  $\mu mol CO_2 mol^{-1}$  air, 40-50% humidity, 250  $\mu mol s^{-1}$  of flow and at the two measuring temperatures (20 °C and 25 °C). Corrections for the leakage of  $CO_2$  in and out of the leaf chamber of the Li-6400 were applied to all gas-exchange data, as described by Flexas *et al.* (2007).

The quantum efficiency of the photosystem II (PSII)-driven electron transport was determined using the equation:  $\phi_{PSII} = (F'_m - F_s) / F'_m$ , where  $F_s$  is the steady fluorescence state in the light (PPFD 1000  $\mu mol quanta m^{-2} s^{-1}$ ) and  $F'_m$  is the maximum fluorescence obtained with a light saturating pulse (8000  $\mu mol quanta m^{-2} s^{-1}$ ). As  $\phi_{PSII}$  represents the number of electrons transferred per photon absorbed by PSII, the electron transport rate (ETR) can be calculated as:  $ETR = \phi_{PSII} \cdot PPFD \cdot \alpha \cdot \beta$ , where PPFD is the photosynthetic photon flux density,  $\alpha$  is the leaf absorptance, and  $\beta$  is the distribution of absorbed energy between the two photosystems, assumed to be 0.5. The leaf absorptance was measured using a chlorophyll fluorescence

system Imaging mini-PAM (Walz, Effeltrich, Germany), reaching values of  $0.787 \pm 0.03$ .

The relationship  $ETR/A_G$  was calculated as the ratio between the electron transport rate and the gross photosynthesis that indicates the amount of reduced power per unit of fixed  $CO_2$ .  $A_G$  was calculated as the sum of  $A_N$  and half of  $R_{dark}$ .

#### 1.4 Stomatal response to different environmental conditions

Instantaneous gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence measurement (Li-6400XT, Li-6400-40 leaf chamber, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) were used to study the stomatal responses ( $g_s$ ) to light,  $CO_2$  concentration and vapor pressure deficit (VPD). Standard environmental conditions inside the leaf cuvette were: leaf temperature of 20 °C, light intensity of 2000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , air humidity of 40-60% and flow of 250  $\mu\text{mol s}^{-1}$  and 400 ppm  $CO_2$ . Prior to the measurements, a minimum period of 30 min was established to ensure steady state conditions for  $g_s$ .

To analyze the  $g_s$  response to light, two light intensities were set: 0  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and 1500  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , and measurements were recorded every 3 min for two hours. For the  $g_s$  response to  $CO_2$  concentration, plants were measured for 2 h at  $C_a$  of 200 ppm  $CO_2$ , 400 ppm  $CO_2$  and 2000 ppm  $CO_2$ , and data were recorded every 3 min. Finally, the  $g_s$  response to VPD was measured in two intervals of 1 to 2 kPa. The VPD values were obtained controlling the relative humidity of the leaf chamber (Li-6400-40; LI-COR Inc.). The initial VPD was established at 1 kPa and after  $g_s$  reached stabilization (between 30-60 min) the data were logged every 3 min for one hour. Then the relative humidity was decreased until a VPD of 2 kPa was achieved, requiring a similar stabilization time of  $g_s$  (30-60 min) to subsequently begin with the data recording every 3 min.

#### 1.5 Estimation of mesophyll conductance, chloroplast $CO_2$ concentration and analysis of quantitative limitations for photosynthesis

*In vivo*  $g_m$  was obtained from combined measurements of gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence. Thus,  $g_m$  was calculated as in Harley *et al.* (1992), according to:  $g_m = A_N / (C_i - (\Gamma^* (ETR + 8(A_N + R_L)) / (ETR - 4(A_N + R_L))))$ , where  $A_N$  and  $C_i$  were obtained from gas exchange measurements at saturating light. The evolution rate of non-photorespiratory  $CO_2$  in the light ( $R_L$ ) was determined as half of  $R_{dark}$ .

The chloroplast CO<sub>2</sub> compensation point ( $\Gamma^*$ ) was calculated according to Brooks & Farquhar (1985) from the Rubisco specificity factor ( $S_{c/o}$ ) measured *in vitro*. To calculate the chloroplast CO<sub>2</sub> concentration ( $C_c$ ), the determination of  $g_m$  was used to calculate  $C_c$ , converting  $A_N-C_i$  curves into  $A_N-C_c$  curves, as  $C_c = C_i - (A_N/g_m)$  (Manter & Kerrigan, 2004). The maximum velocity of carboxylation ( $V_{cmax}$ ) was derived from  $A_N-C_c$  curves, according to Farquhar *et al.* (1980) and using the kinetics constants for Rubisco determined for *A. araucana* at 25 °C (see below). The Rubisco kinetics values at 20 °C were calculated from the values measured at 25 °C by applying the thermal dependencies reported for tobacco by Bernacchi *et al.* (2001). The quantitative limitations related to stomatal conductance ( $l_s$ ), mesophyll conductance ( $l_m$ ) and leaf biochemical ( $l_b$ ) were calculated using  $A_N$ ,  $g_s$ ,  $g_m$  and  $V_{cmax}$  values according to Grassi & Magnani (2005).

### 1.6 Anatomical determination of $g_m$

The Tomás *et al.* (2013) approach was used for anatomical modeling of  $g_m$ . The central portion of leaves located in the middle section of the trees were fixed in formaldehyde, acetic acid, and ethanol (FAA), and 3.7% glutaraldehyde, for optical and transmission electron microscopy (EM1200 EXII; Japan Jeol Ltd, Tokyo, Japan), respectively. Six and nine micrographs were randomly selected to measure the mesophyll thickness, the mesophyll area exposed to intercellular air space ( $S_m$ ) to the total leaf surface ( $S$ ) area ratio ( $S_m/S$ ), the chloroplast exposed surface area to the total surface area ratio ( $S_c/S$ ), the chloroplast length ( $L_{chl}$ ), the chloroplast thickness ( $T_{chl}$ ), and the cell wall thickness ( $T_{cw}$ ). All images were analyzed with ImageJ software (Wayne Rasband/NIH, Bethesda, MD, USA). The one-dimensional gas diffusion model of Niinemets & Reichstein (2003) applied by Tomás *et al.* (2013) was employed to estimate the different leaf anatomical characteristics determining  $g_m$ . The determinants of  $g_m$  were divided between gas-phase conductance and the different components of the cellular phase conductances: the cell wall ( $l_{cw}$ ), the plasmalemma ( $l_{pl}$ ), and inside the cells through the cytosolic path ( $l_{cel,tot}$ ).

### 1.7 Foliar structural measurements

To obtain the leaf dry mass per unit of leaf area (LMA), leaf samples were taken, photographed, and analyzed with the ImageJ program to calculate the leaf area.



Thereafter, the same leaves were dried in an oven at 65 °C for 72 h to obtain the dry weight. To determine leaf density (LD), LMA was divided by the mesophyll width of the cross sections of the same leaf (Niinemets, 1999; Niinemets *et al.*, 1999).

The leaf relative water content (% RWC) was calculated as: (fresh weight - dry weight)/(turgid weight - dry weight)\*100 of 3 leaves freshly collected from each tree. The turgid weight was determined from the weight of leaves immersed in distilled water at 4 °C for 48 h in the dark, and the dry weight was obtained after drying the leaves in an oven at 65 °C for 72 h.

### 1.8 Composition of the $\delta^{13}\text{C}$ isotope and foliar nitrogen content

For the  $\delta^{13}\text{C}$  isotope analysis, leaf samples collected randomly from the middle section of the trees were burned in an elemental analyzer (Thermo Flash EA Serie 1112, Bremen, Alemania), and  $\text{CO}_2$  and  $\text{N}_2$  were injected directly into a continuous flow Isotope Ratio Mass Spectrometer (Thermo-Finnigan Delta XP, Bremen, Alemania). The total nitrogen concentration of the leaf was calculated from the area obtained from the mass spectrometer. The results for  $\delta^{13}\text{C}$  are presented as  $\delta$  versus standard Pee Dee Belemnite (PDB), and the nitrogen content in the leaf as  $\text{mg N g}^{-1}$  dry weight (Galmés *et al.*, 2011).

### 1.9 Kinetics and Rubisco specificity ( $S_{c/o}$ )

The Rubisco carboxylase turnover rate ( $k_{\text{cat}}^{\text{c}}$ ) and the Michaelis–Menten constant for  $\text{CO}_2$  under 100%  $\text{N}_2$  ( $K_{\text{c}}$ ) or under 21%  $\text{O}_2$  ( $K_{\text{c}}^{\text{air}}$ ) were determined at 25 °C in crude protein extracts following the method described by Iñiguez *et al.* (2019). The only modification was an increase in the quantity of polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) added to the extraction buffer (0.2 g FW leaves and 0.2 g PVPP in 2 ml extraction buffer). The total soluble protein content was determined according to Bradford (1976). The Michaelis–Menten constant for  $\text{O}_2$  ( $K_{\text{o}}$ ) was calculated as:  $K_{\text{o}} = (K_{\text{c}} * [\text{O}_2]) / (K_{\text{c}}^{\text{air}} - K_{\text{c}})$ , where  $[\text{O}_2]$  represents an air-saturated  $\text{O}_2$  concentration in the assay buffer of 258  $\mu\text{M}$ . For  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  specificity ( $S_{c/o}$ ) measurements at 25 °C, crude extracts were applied to a 5 ml Bio-Scale Mini Macro-Prep High Q ion exchange column (Biorad) equilibrated with column buffer (50 mM EPPS-NaOH, pH 8.0, 1 mM EDTA). Bound proteins were eluted in 3 ml of column elution buffer (50 mM EPPS-NaOH, pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) and concentrated to 0.5 ml using an



Amicon Ultra-4 centrifugal filter (100 KDa, Millipore). These semi-purified Rubisco extractions were used to measure  $S_{c/o}$  following the method described by Kane *et al.* (1994). Replicate measurements for all Rubisco kinetics were carried out using independent protein extractions from different individuals ( $n= 4 - 6$ ) and wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Cajeme) was used as a control.

## 2.1 Statistical analysis

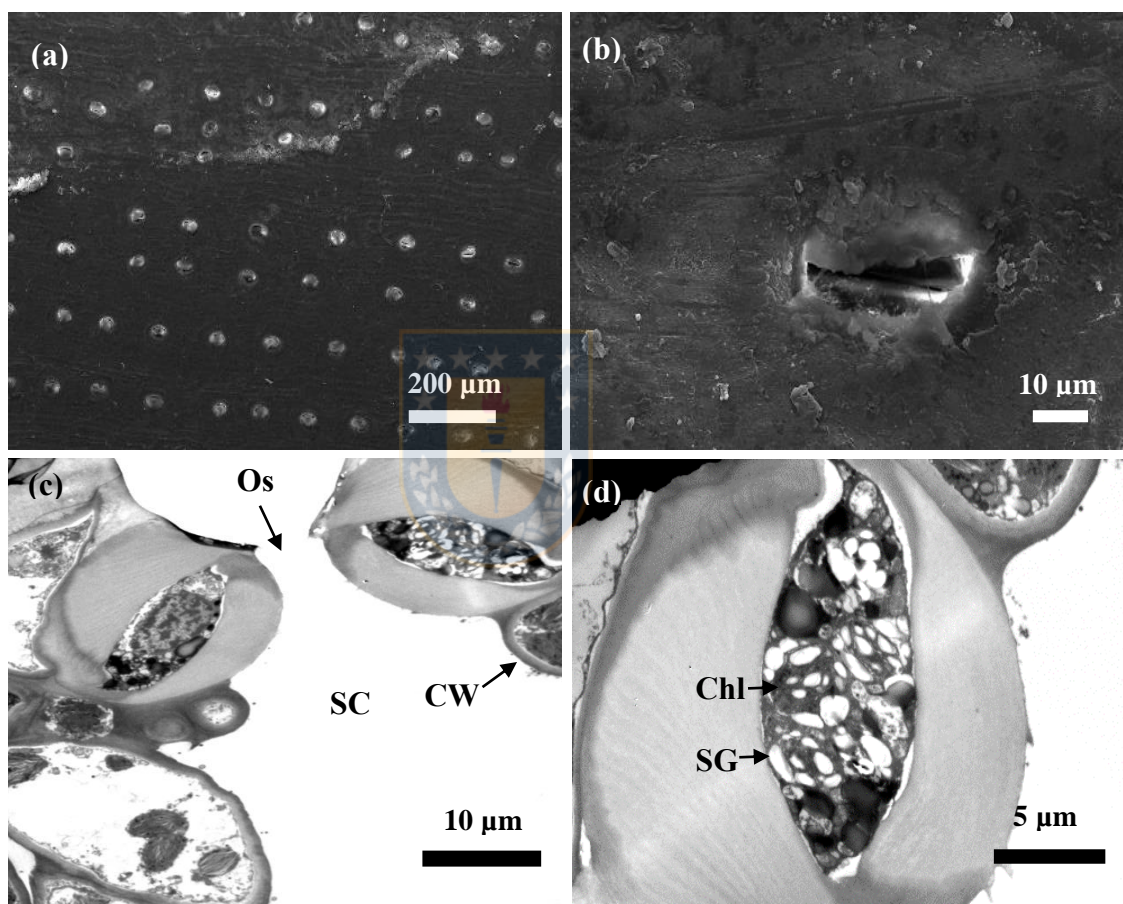
Three to six plants were used for all of the measurements performed. To test for significant differences in the stomata parameters between adaxial and abaxial foliar faces a Student's t-test ( $P < 0.05$ ) was used. To determine the change in the stomatal response rate to irradiance,  $CO_2$  and VPD, the slopes obtained by fitted linear regressions were compared using SigmaPlot Version 10.0 software (SPSS; Chicago, IL, USA). To provide statistical differences for irradiance and VPD, a Student's t-test ( $P < 0.05$ ) was used, along with a one-way ANOVA and Tukey test ( $P < 0.05$ ) for the three levels of  $CO_2$ . The values of each point of the response curves of  $A_N$  to light and temperature were compared using one-way ANOVA with STATISTICA 8.0 software (Statsoft, Tulsa, USA). A Student's t-test was used to compare the photosynthetic parameters and quantitative analysis limitations obtained at 20 °C and 25 °C. A Pearson correlation analysis was performed to assess the relationships between  $A_N$  and  $g_s$ ,  $g_m$ , ETR,  $V_{cmax}$  and the anatomical traits,  $T_{cw}$  and LMA using SigmaPlot Version 10.0 software.

## RESULTS

### 3.1 Stomatal traits and their response to different environmental conditions

*Araucaria araucana* is an amphistomatic species with a paracytic disposition (Fig. 1a) whose stomata are conspicuously covered by abundant epicuticular waxes (Fig. 1b). Its stomatal apparatus is also characterized by a wide sub-stomatal chamber formed by voluptuous guard cells (Fig. 1c-1d). In general, adaxial and abaxial surfaces showed no significant differences, at least in the traits evaluated here (Table 1). Stomatal density (SD) showed values around 45-50 stomata per  $mm^{-2}$ , with an average stomatal size (S) of 1551 and 1583  $\mu m^2$  for adaxial and abaxial surfaces, respectively. Based on these parameters, the stomatal area index (SAI) showed

differences between leaf surfaces, where the adaxial surface presented significantly lower values than the abaxial surface ( $0.07 \pm 0.002 \text{ mm}^2 \text{ stomata mm}^{-2} \text{ leaf}$  and  $0.08 \pm 0.003 \text{ mm}^2 \text{ stomata mm}^{-2} \text{ leaf}$ , respectively). The stomatal length (SL), stomatal width (SW), pore length (PL) and pore depth (PD) were non-significantly different between adaxial and abaxial surfaces. These traits and the maximum stomatal pore area ( $\alpha_{\text{max}}$ ) were used to calculate  $g_{\text{wmax}}$ , which presented higher values in the abaxial surface ( $0.43 \pm 0.02 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) compared to the adaxial surface ( $0.36 \pm 0.01 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

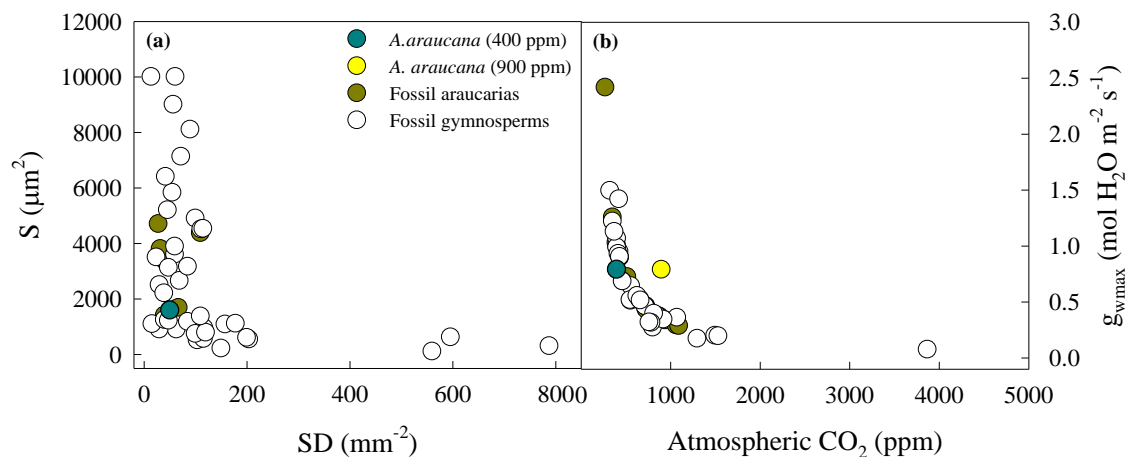


**Fig. 1** (a) Scanning electron micrographs of abaxial leaf surface of *A. araucana*, (b) stomata covered by epicuticular waxes, (c) transversal leaf section of substomatal cavity, and (d) cross-section of an guard cell. Ostiole (Os), cell wall (CW), stomatal cavity (SC), chloroplast (Chl) and starch grain (SG).

**Table 1** Stomata anatomical traits of *A. araucana*: stomatal density (SD), stomatal size (S), stomatal area index (SAI), stomatal length (SL), stomatal width (SW), pore length (PL), pore depth (PD), maximum stomatal pore area ( $\alpha_{\max}$ ) and anatomical maximum stomatal conductance to water vapor ( $g_{w\max}$ ). Values are means  $\pm$  S.E. ( $n = 5$ ). \* indicates significant differences between adaxial and abaxial surfaces according to Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

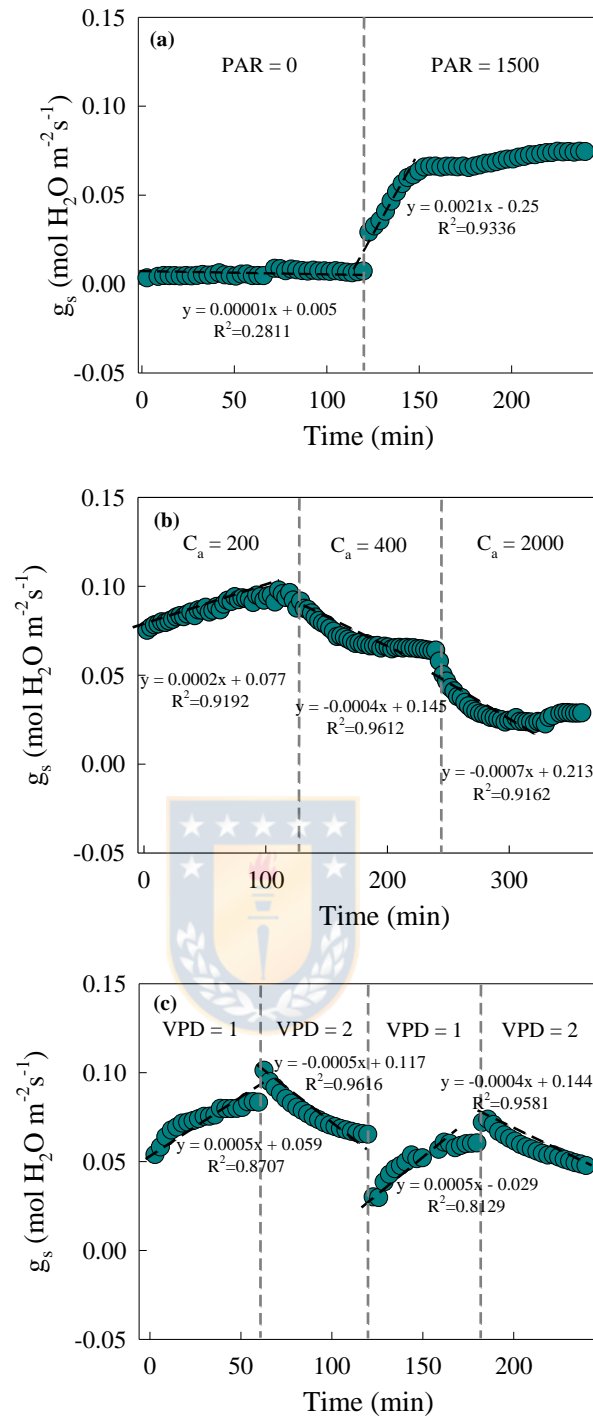
Parameter	Adaxial surface	Abaxial Surface
SD ( $\text{mm}^{-2}$ )	45.14 $\pm$ 1.65	50.64 $\pm$ 2.56
S ( $\mu\text{m}^2$ )	1551 $\pm$ 64	1583 $\pm$ 55
SAI ( $\text{mm}^2$ stomata $\text{mm}^{-2}$ leaf)	0.07 $\pm$ 0.002	0.08 $\pm$ 0.003*
SL ( $\mu\text{m}$ )	52.38 $\pm$ 1.31	53.68 $\pm$ 1.31
SW ( $\mu\text{m}$ )	29.47 $\pm$ 0.59	29.38 $\pm$ 0.39
PL ( $\mu\text{m}$ )	23.36 $\pm$ 0.76	24.46 $\pm$ 0.70
PD ( $\mu\text{m}$ )	14.73 $\pm$ 0.29	14.69 $\pm$ 0.2
$\alpha_{\max}$ ( $\mu\text{m}^2$ )	217.44 $\pm$ 14.56	237.74 $\pm$ 13.16
$g_{w\max}$ ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	0.36 $\pm$ 0.01	0.43 $\pm$ 0.02*

When testing the leaf economics spectrum (LES) in fossil gymnosperms and fossil araucarias (Franks & Beerling, 2009), *A. araucana* was found to rank among the lowest values of S and SD (Fig. 2a). Furthermore, when considering the atmospheric CO<sub>2</sub> concentration of each species, *A. araucana* evaluated at CO<sub>2</sub> conditions at the time of its appearance showed a  $g_{w\max}$  far from the general trend, however, under the current atmospheric CO<sub>2</sub> concentration it coupled to the distribution of the fossil gymnosperms (Fig. 2b).



**Fig. 2** (a) Relationship between stomatal size (S) and stomatal density (SD) of *A. araucana*, fossil araucarias and fossil gymnosperms, and (b) the relationship between the total anatomical maximum stomatal conductance to water vapor ( $g_{w\text{max}}$ ) and the atmospheric  $\text{CO}_2$  concentration modelled for each fossil species. For *A. araucana*, current atmospheric  $\text{CO}_2$  concentration of 400 ppm and the reported in the Jurassic period of 900 ppm were used. Data for fossil araucarias and fossil gymnosperms were taken from Franks & Beerling (2009) and Franks *et al.* (2014).

Regarding the short-term stomatal responses to varying environmental conditions, significant differences in  $g_s$  were detected in response to the transition from dark to light and to the different  $\text{CO}_2$  concentrations, though significant differences were not observed in VPD (Fig. 3, Table S2). When *A. araucana* leaves were maintained in the dark for two hours, they kept their stomata practically closed ( $g_s = 0.006 \pm 0.002 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). After the light intensity increased to  $1500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $g_s$  increased slowly within the first 39 min (steep slope) (details of curves in complementary information, Fig. S2a), following a continuous increase until reaching a  $g_s$  of  $0.07 \pm 0.007 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  at 240 min (Fig. 3a). As the  $\text{CO}_2$  concentration increased from  $200 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  to  $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  and finally  $2000 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ,  $g_s$  decreased significantly from  $0.095 \pm 0.011$  to  $0.064 \pm 0.005$  and to  $0.028 \pm 0.002 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectively. The time required for *A. araucana* to reach the stable state of  $g_s$  at a concentration of 400 ppm was 75 min and it took 99 min to achieve stabilization of  $g_s$  at 2000 ppm (Fig. 3b, Fig. S2b). No changes were detected between the two VPD assayed maintaining on average values of  $0.063 \pm 0.004 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Fig. 3c, Fig. S2c).




**Fig. 3** (a) Stomatal response curve ( $g_s$ ) of *A. araucana* at photosynthetically active radiation, PAR ( $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (b) atmospheric  $\text{CO}_2$  concentration,  $C_a$  ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ) and (c) vapor pressure deficit, VPD (kPa). The gray dashed vertical line shows the moment of change in environmental conditions. Linear regression equation of slopes is shown ( $n = 4 - 5$ ).

### 3.2 Photosynthesis response to light, temperature and CO<sub>2</sub> concentration

The photosynthetic response of *A. araucana* to different light intensities (Fig. S3a) showed a light saturation point (LSP) at 456.37  $\mu\text{mol}$  of photons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  with a net photosynthesis ( $A_N$ ) of  $6.57 \pm 1.18 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Table 2). The light compensation point ( $I_{\text{comp}}$ ), the apparent quantum yield ( $\phi$ ) and the curvature factor ( $\theta$ ) were  $43.11 \pm 7.15 \mu\text{mol}$  of photons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $0.02 \pm 0.002 \text{ mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  photons and  $0.98 \pm 0.006$ , respectively (Table 2).

**Table 2** Parameters derived from the net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A_N$ ) response curve to light and temperature in *A. araucana*: light saturation point (LSP), maximum net photosynthetic rate ( $A_{\text{max}}$ ), light compensation point ( $I_{\text{comp}}$ ), apparent quantum yield ( $\phi$ ), curvature factor ( $\theta$ ) and optimum leaf temperature for photosynthesis ( $T_{\text{opt}}$ ). Values are means  $\pm$  S.E. ( $n = 3 - 4$ ).

Parameters		
LSP ( $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )		$456.37 \pm 63.5$
$A_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )		$6.57 \pm 1.18$
$I_{\text{comp}}$ ( $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )		$43.11 \pm 7.15$
$\phi$ ( $\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ photons)		$0.02 \pm 0.002$
$\theta$ (dimensionless)		$0.98 \pm 0.006$
$T_{\text{opt}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )		$19.94 \pm 0.36$

Across the range of analyzed temperatures,  $A_N$  presented the lowest values at 10 and 30  $^{\circ}\text{C}$ , with  $3.34 \pm 0.39$  and  $4.7 \pm 0.26 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectively (Fig. S3b). The optimum leaf temperature for photosynthesis ( $T_{\text{opt}}$ ) was 19.94  $^{\circ}\text{C}$  according to the polynomial function fitted to the temperature response curve (Table 2,  $R^2 = 0.8614$ ).

At CO<sub>2</sub> concentration of 400  $\mu\text{mol}$  of CO<sub>2</sub>  $\text{mol}^{-1}$  and saturating light of 2000  $\mu\text{mol}$  of photons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $A_N$  was twofold higher at 20  $^{\circ}\text{C}$  than at 25  $^{\circ}\text{C}$  ( $6.24 \pm 0.77$  and  $3.16 \pm 0.37$ , respectively) (Table 3). Therefore, at 20  $^{\circ}\text{C}$  the response of  $A_N$  to the variable concentration of substomal CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ) was higher (Fig. S4). Values for  $g_s$  followed the same trend, being  $0.07 \pm 0.009 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at 20  $^{\circ}\text{C}$  and  $0.03 \pm 0.004 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at 25  $^{\circ}\text{C}$ . Accordingly, the intrinsic water use efficiency ( $A_N/g_s$ ) did not differ between plants measured at different leaf temperatures.

**Table 3** Photosynthetic parameters and quantitative analysis limitation of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation of *A. araucana* measured at ambient CO<sub>2</sub> concentration and two measurement temperatures (20 °C and 25 °C). Net photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A_N$ ), stomatal conductance ( $g_s$ ), mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> obtained through Harley's method ( $g_m$ ), total leaf conductance to CO<sub>2</sub> ( $g_{tot}$ ), intrinsic water use efficiency ( $A_N/g_s$ ), dark mitochondrial respiration ( $R_{dark}$ ), electron transport rate (ETR), ratio of the electron transport rate and gross photosynthesis (ETR/ $A_G$ ), substomatal CO<sub>2</sub> concentration ( $C_i$ ), maximum Rubisco carboxylation rate ( $V_{cmax}$ ), stomatal limitation ( $l_s$ ), limitation due to mesophyll ( $l_m$ ) and biochemistry ( $l_b$ ). Values are means  $\pm$  S.E. ( $n = 3 - 4$ ). \* indicates significant differences between measurement temperatures according to Student's t-test ( $P < 0.05$ ). Different letters indicate significant differences among quantitative limitations according to ANOVA and Tukey's test ( $P < 0.05$ ).

Parameter	Measurement temperature	
	20 °C	25 °C
$A_N$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	6.24 $\pm$ 0.77	3.16 $\pm$ 0.37*
$g_s$ ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	0.07 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.004*
$g_m$ ( $\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	0.05 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01
$g_{tot}$ ( $\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	0.02 $\pm$ 0.003	0.01 $\pm$ 0.002*
$A_N/g_s$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ )	91.98 $\pm$ 6.56	108.84 $\pm$ 2.71
$R_{dark}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	-0.54 $\pm$ 0.04	-0.57 $\pm$ 0.09
ETR ( $\mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	55.54 $\pm$ 5.69	33.58 $\pm$ 1.63*
ETR/ $A_G$ ( $\mu\text{mol e}^- \mu\text{mol}^{-1} \text{ CO}_2$ )	8.59 $\pm$ 0.3	10.2 $\pm$ 0.97
$C_i$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ air}$ )	243.49 $\pm$ 10.1	214.74 $\pm$ 4.57*
$V_{cmax}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	38.41 $\pm$ 2.93	19.8 $\pm$ 0.81*
$l_s$ %	37.66 $\pm$ 2.64 <sup>a</sup>	44.78 $\pm$ 1.14 <sup>*a</sup>
$l_m$ %	31.63 $\pm$ 1.93 <sup>a</sup>	18.88 $\pm$ 3.04 <sup>*b</sup>
$l_b$ %	30.7 $\pm$ 1.54 <sup>a</sup>	36.33 $\pm$ 3.78 <sup>a</sup>

The combined analysis of leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence showed that  $g_m$  was lower than  $g_s$  at 20 °C ( $g_m = 0.05 \pm 0.01 \text{ mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), but not at 25 °C ( $g_m = 0.05 \pm 0.01 \text{ mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). The low values for  $g_s$  and  $g_m$  determined

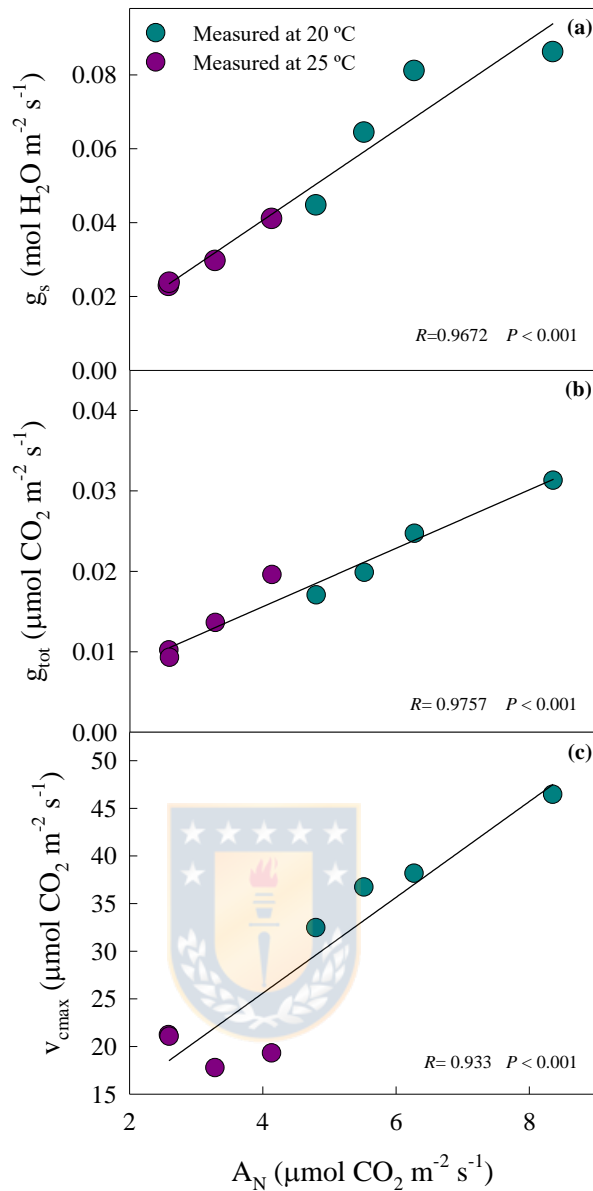


remarkably low values for the total leaf conductance to CO<sub>2</sub> ( $g_{\text{tot}}$ ), which, like  $g_s$ , strongly correlated with  $A_N$  (Fig. 4), indicating that  $A_N$  was mainly limited by diffusional components. Actually, the quantitative contribution of stomatal ( $l_s$ ), mesophilic ( $l_m$ ) and biochemistry ( $l_b$ ) limitations on photosynthesis showed that, at 20 °C,  $l_s$  and  $l_m$  accounted for ca. 70 % of total limitation to  $A_N$  (Table 3). At 25 °C,  $l_s$  and  $l_b$  were significantly more limiting than  $l_m$ .

The rate of mitochondrial respiration under darkness ( $R_{\text{dark}}$ ) was similar for the two measurement temperatures (around  $0.56 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), therefore suggesting that the observed differences in  $A_N$  were not due to differences in mitochondrial respiration. The electron transport rate (ETR) showed a significant decrease with the increase in the leaf temperature, consistent with the reduction observed in  $A_N$  (Table 3). In consequence, temperature did not significantly alter ETR/ $A_G$  values. The maximum Rubisco carboxylation rate ( $V_{\text{cmax}}$ ) also showed differences between measurement temperatures, decreasing from  $38.41 \pm 2.93 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  at 20 °C to  $19.8 \pm 0.81 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  at 25 °C. Consequently,  $V_{\text{cmax}}$  correlated linearly with  $A_N$ , as occurred with  $g_s$  and  $g_{\text{tot}}$  (Fig. 4).



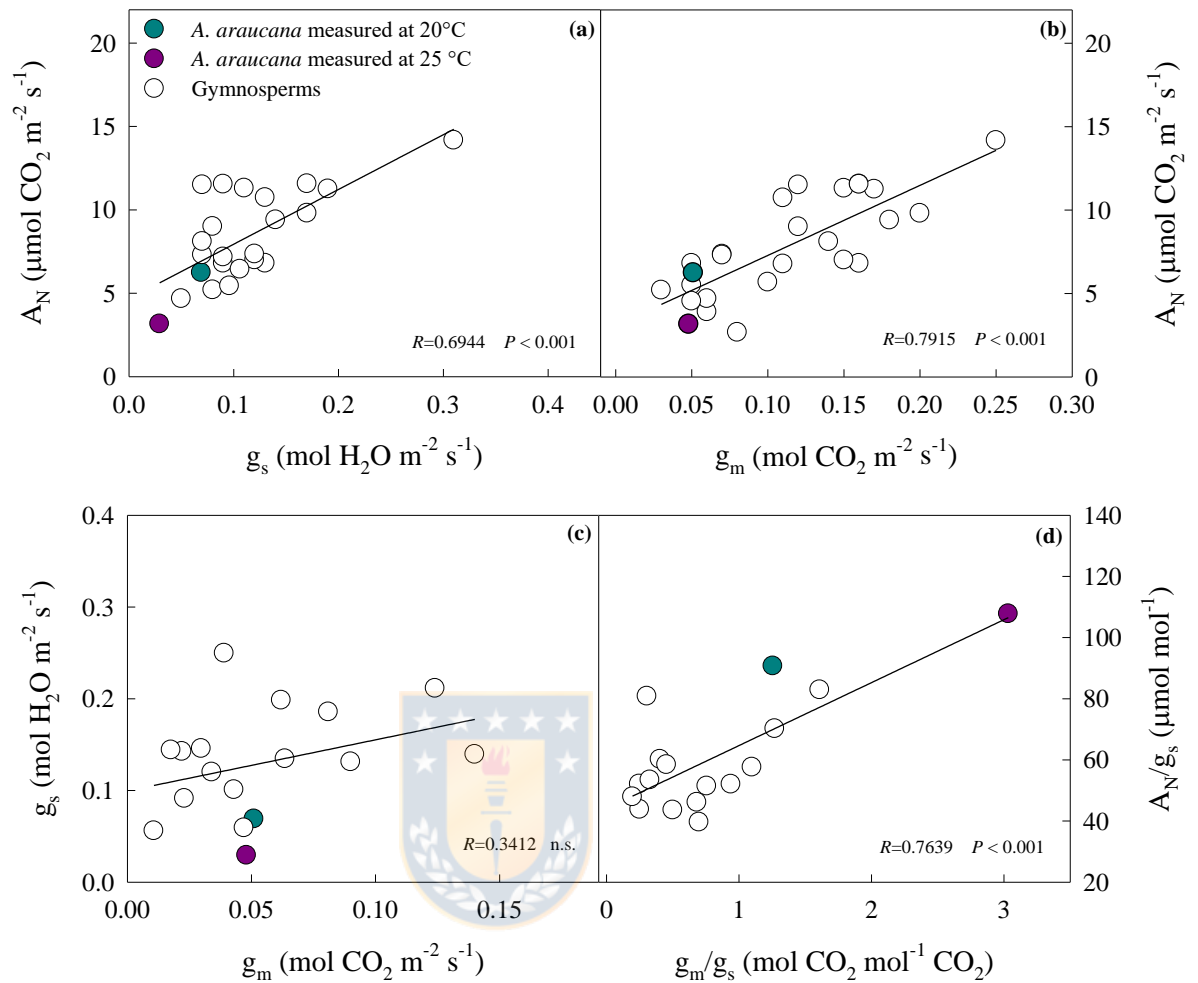




**Fig. 4** (a) The relationship between the stomatal conductance ( $g_s$ ), (b) the total leaf conductance to CO<sub>2</sub>, and (c) the maximum Rubisco carboxylation rate ( $V_{\text{cmax}}$ ) with the net photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A_N$ ) in *A. araucana* measured at leaf temperature of 20 °C and 25 °C. Regression coefficient and the significance of the relationship are shown ( $n = 4$ ).

When comparing with other gymnosperms, *A. araucana* showed the lowest values for the relationships  $A_N$  vs.  $g_s$  (Fig. 5a) and  $A_N$  vs.  $g_m$ , particularly at 25 °C (Fig. 5b). A similar trend for lower values in *A. araucana* was observed in the relationship  $g_s$  vs.  $g_m$ . Again, *A. araucana* represented an exceptional species in the

relationship  $A_N/g_s$  vs.  $g_m/g_s$ , being outlier as compared to the rest of gymnosperms (data from Gago *et al.*, 2019).



**Fig. 5** (a) The relationship between the net photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A_N$ ) and the stomatal conductance ( $g_s$ ), and (b) the leaf mesophyll conductance ( $g_m$ ), (c) the relationship between  $g_s$  and  $g_m$ , and (d) the relationship between the intrinsic water use efficiency ( $A_N/g_s$ ) and the ratio  $g_m/g_s$ . Represented data include the values of *A. araucana* measured at 20 °C and 25 °C in the present study and data for gymnosperms measured between 20 °C and 26 °C obtained from Onoda *et al.* (2017) and Gago *et al.* (2019). Regression coefficient and the significance of the relationship are shown.

### 3.3 Rubisco kinetic parameters and specificity factor

The Rubisco kinetic parameters measured *in vitro* at 25 °C (Table 4) showed a Rubisco Michaelis constant for CO<sub>2</sub> ( $K_c$ ) of  $21.13 \pm 0.88 \mu\text{M}$  and for O<sub>2</sub> ( $K_o$ ) of 1049

$\pm 180 \mu\text{M}$ . The maximum carboxylase catalytic turnover rate ( $k_{\text{cat}}^{\text{c}}$ ) was  $2.54 \pm 0.13 \text{ s}^{-1}$  and the ratio  $k_{\text{cat}}^{\text{c}}/K_{\text{c}}$  was  $0.12 \pm 0.01 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ . The Rubisco specificity factor ( $S_{\text{c/o}}$ ) was  $93.37 \pm 1.89 \text{ mol mol}^{-1}$ . When testing the distribution of Rubisco catalytic parameters of *A. araucana* at 25 °C among  $\text{C}_3$  plants (Iñiguez *et al.*, 2020), this species presented some particular traits, specifically a remarkable low affinity for  $\text{O}_2$ , i.e., high  $K_{\text{o}}$  (Fig. S5a). The value of  $k_{\text{cat}}^{\text{c}}/K_{\text{c}}$  for Rubisco from *A. araucana* was among the lowest for  $\text{C}_3$  plants (Fig. S5b), although  $S_{\text{c/o}}$  values were within the range of variation reported for  $\text{C}_3$  plants (Fig. S5c).

**Table 4** *In vitro* Rubisco kinetic parameters of *A. araucana* measured at 25 °C. The Rubisco Michaelis-Menten constant for  $\text{CO}_2$  ( $K_{\text{c}}$ ) and  $\text{O}_2$  ( $K_{\text{o}}$ ), the maximum carboxylase catalytic turnover rate ( $k_{\text{cat}}^{\text{c}}$ ), the carboxylase catalytic efficiency ( $k_{\text{cat}}^{\text{c}}/K_{\text{c}}^{\text{air}}$ ), and the Rubisco specificity factor ( $S_{\text{c/o}}$ ). Values are means  $\pm$  S. E. ( $n = 4 - 6$ ). For comparative purposes, we also measured the kinetic parameters at 25 °C in Rubisco from wheat (*Triticum aestivum* ‘Cajerne’). The values were as follows:  $K_{\text{c}} = 9.66 \mu\text{M}$ ;  $k_{\text{cat}}^{\text{c}} = 2.3 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{\text{cat}}^{\text{c}}/K_{\text{c}} = 0.24 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ;  $S_{\text{c/o}} = 89.7 \text{ mol mol}^{-1}$ .

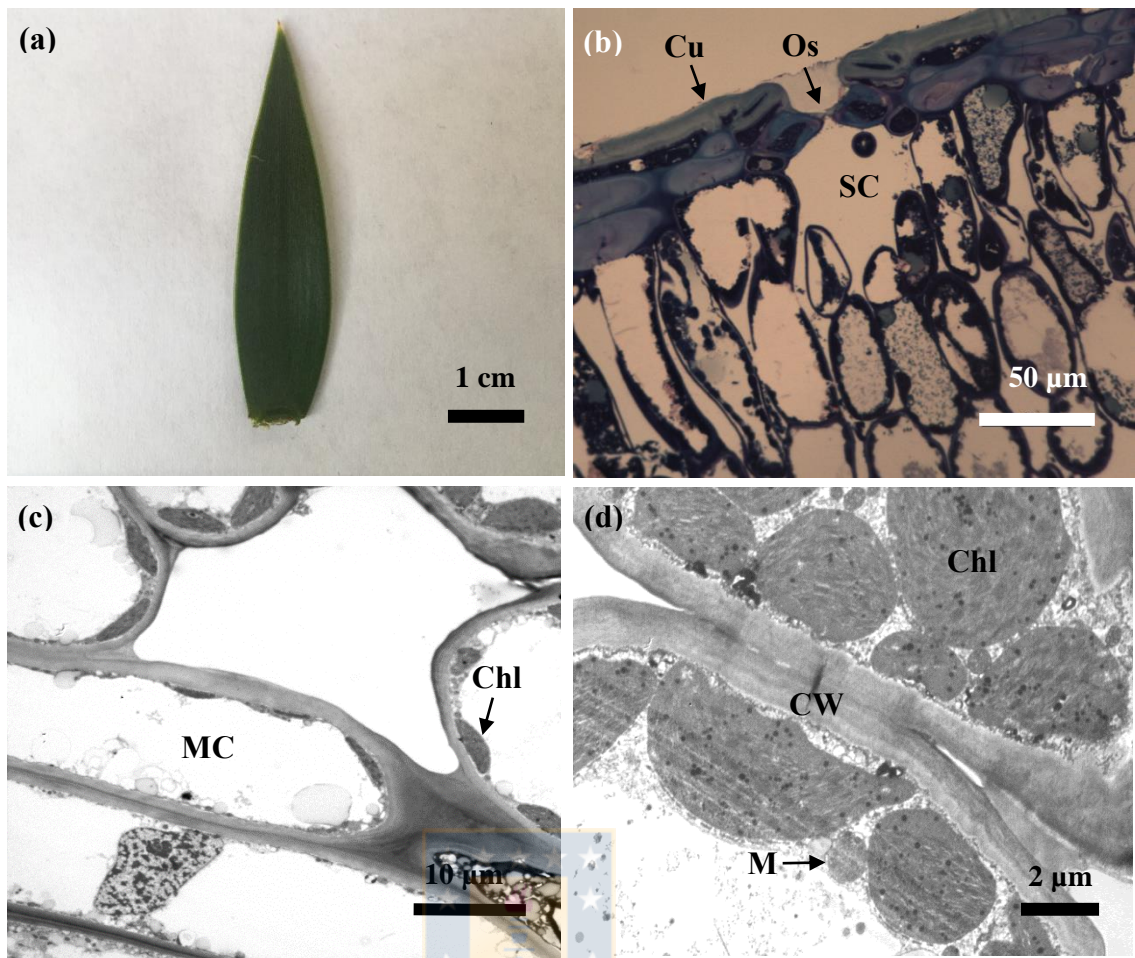
Temperature	$K_{\text{c}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{\text{o}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}^{\text{c}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}^{\text{c}}/K_{\text{c}}$ ( $\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ )	$S_{\text{c/o}}$ ( $\text{mol mol}^{-1}$ )
25 °C	$21.13 \pm 0.88$	$1049 \pm 180$	$2.54 \pm 0.13$	$0.12 \pm 0.01$	$93.37 \pm 1.89$

### 3.4 Anatomical $g_{\text{m}}$ and leaf structure

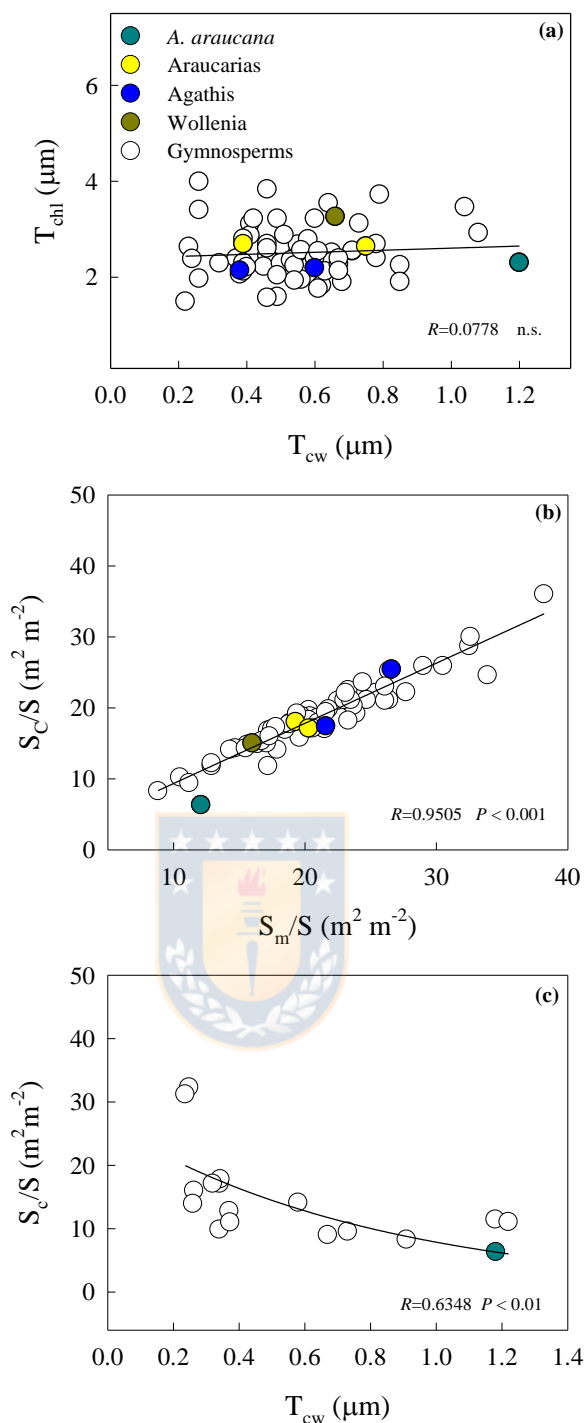
Anatomy-based  $g_{\text{m}}$  values were lower than those estimated by the Harley *et al.* (1992) method, confirming that leaves of *A. araucana* have a limited ability to deliver  $\text{CO}_2$  towards the carboxylation sites (Table 5). All the anatomical traits evaluated, that determine  $g_{\text{m}}$ , indicated a highly xerophytic species (Table 5; Fig. 6). *A. araucana* showed a high mesophyll thickness ( $760.53 \pm 6.69 \mu\text{m}$ ), with chloroplasts  $5.64 \pm 0.22 \mu\text{m}$  long and  $2.29 \pm 0.17 \mu\text{m}$  thick (Fig. 6d), distributed circumferentially at  $0.26 \pm 0.05 \mu\text{m}$  ( $\Delta L_{\text{cyt}}$ ) from the cell wall (Fig. 6c-6d). Within gymnosperms, including living species of the Araucariaceae, *A. araucana* presented extremely high values of cell wall thickness ( $T_{\text{cw}} = 1.2 \pm 0.09 \mu\text{m}$ ) and the lowest reported value of chloroplast surface area exposed to intercellular airspace ( $S_{\text{c}}/S = 6.3 \pm 0.2 \text{ m}^2 \text{ m}^{-2}$ ) (Fig. 7).

**Table 5** The leaf mesophyll conductance for *A. araucana* modeled through anatomical parameters ( $g_m$ ), the mesophyll thickness between the two epidermal layers ( $T_{mes}$ ), the chloroplast thickness ( $T_{chl}$ ), the chloroplast length ( $L_{chl}$ ), the average distance between the chloroplasts and the cell wall ( $\Delta L_{cyt}$ ), the cell wall thickness ( $T_{cw}$ ), the chloroplast surface area exposed to intercellular airspace ( $S_c/S$ ), the mesophyll surface area exposed to intercellular airspace ( $S_m/S$ ), the intercellular air space ( $g_{ias}$ ), the liquid phase ( $g_{liq}$ ), the percentage of limitation of the leaf mesophyll conductance to  $CO_2$  by intercellular spaces ( $l_{ias}$ ), cell wall ( $l_{cw}$ ), plasmalemma ( $l_{pl}$ ) and inside the cell ( $l_{cel, tot}$ ). The leaf mass area (LMA), the leaf density (LD), the relative water content (RWC), the nitrogen content (N) and the leaf carbon isotopic composition ( $\delta^{13}C$ ). Values are means  $\pm$  S.E. ( $n = 3 - 5$ ).

Parameter	
$g_m$ (mol $CO_2$ $m^{-2}$ $s^{-1}$ )	0.03 $\pm$ 0.002
$T_{mes}$ ( $\mu m$ )	760.53 $\pm$ 6.69
$T_{chl}$ ( $\mu m$ )	2.29 $\pm$ 0.17
$L_{chl}$ ( $\mu m$ )	5.64 $\pm$ 0.22
$\Delta L_{cyt}$ ( $\mu m$ )	0.26 $\pm$ 0.05
$T_{cw}$ ( $\mu m$ )	1.18 $\pm$ 0.09
$S_m/S$ ( $m^2$ $m^{-2}$ )	12.09 $\pm$ 0.32
$S_c/S$ ( $m^2$ $m^{-2}$ )	6.33 $\pm$ 0.29
$g_{ias}$ ( $m$ $s^{-1}$ )	0.01 $\pm$ 0.001
$g_{liq}$ ( $m$ $s^{-1}$ )	0.001 $\pm$ 0.001
$l_{ias}$ (%)	9.73 $\pm$ 1.3
$l_{cw}$ (%)	87.07 $\pm$ 2.82
$l_{pl}$ (%)	2.37 $\pm$ 0.14
$l_{cel, tot}$ (%)	25.89 $\pm$ 1.8
LMA ( $g$ $m^{-2}$ )	290.4 $\pm$ 19
LD ( $g$ $cm^{-3}$ )	0.28 $\pm$ 0.02
RWC %	73 $\pm$ 0.49
N (%)	1.29 $\pm$ 0.05
$\delta^{13}C$	-26.97 $\pm$ 0.27



**Fig. 6** (a) Leaf, (b) mesophyll transverse section, (c) mesophyll cell and (d) chloroplast of *A. araucana*. Cuticle (Cu), Ostiole (Os), stomatal cavity (SC), mesophyll cell (MC), chloroplast (Chl), cell wall (CW) and mitochondria (M).

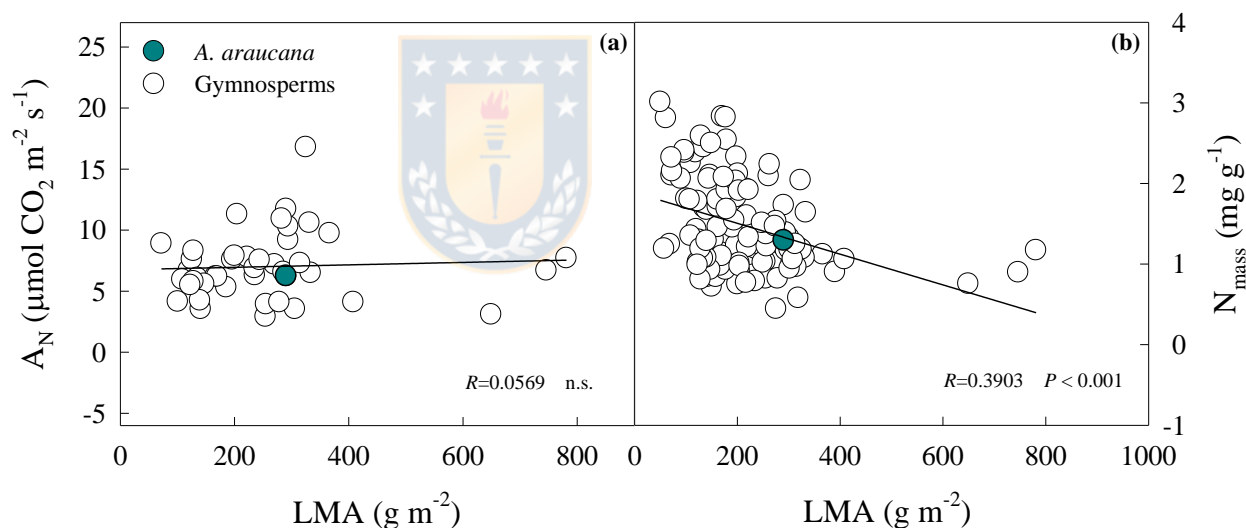


**Fig. 7** Distribution of leaf anatomical traits of *A. araucana* among gymnosperms and other ancient taxon. (a) The relationship between the chloroplast thickness ( $T_{chl}$ ) and the cell wall thickness ( $T_{cw}$ ), (b) between the chloroplast surface area exposed to intercellular airspace ( $S_c/S_m$ ) and the mesophyll surface area exposed to intercellular airspace ( $S_m/S$ ), and (c) between  $S_c/S$  and  $T_{cw}$  in *A. araucana*. Data for Araucariaceae and gymnosperms were taken from Veromann-Jürgenson *et al.* (2020a), and data for gymnosperms from Gago *et al.* (2019). Regression coefficient and the significance of

the relationship are shown.

The CO<sub>2</sub> transfer conductance across the liquid phase ( $g_{liq}$ ) was one order lower than that across the intercellular airspace ( $g_{ias}$ ), which yielded a low quantitative  $g_m$  limitation by the intercellular air spaces ( $l_{ias}$ ) (Table 5). Regarding the different components that limit  $g_{liq}$ , the limitations of the cell wall accounted for 87% of the  $g_{liq}$  limitation, and therefore, the thick cell walls are the main responsible of the low internal diffusion of CO<sub>2</sub> observed in *A. araucana* leaves.

The leaf mass area (LMA) in *A. araucana* was  $290.41 \pm 19 \text{ g m}^{-2}$  with a leaf density of  $0.28 \pm 0.02 \text{ g cm}^{-3}$  and a relative water content of  $73 \pm 0.49\%$ . We found a foliar nitrogen content of  $1.29 \pm 0.05\%$  and a leaf carbon isotopic composition ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of  $-26.97 \pm 0.27$  (Table 5). When comparing with other gymnosperms, *A. araucana* presented values for LMA and nitrogen content within the average for this group (Fig. 8).



**Fig. 8** The relationships between the leaf mass area (LMA) and (a) the net photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A_N$ ) at 20 °C, and (b) the leaf nitrogen for *A. araucana* (present study) and other gymnosperms (taken from Gago *et al.*, 2019). Regression coefficient and the significance of the relationship are shown.



## DISCUSSION

### 4.1 *A. araucana* has a notably slow stomatal response to light and CO<sub>2</sub> concomitant with evolutionary old anatomical traits

*A. araucana* evolved 205-180 million years ago (Panti *et al.*, 2012), when the atmospheric CO<sub>2</sub> concentration far exceeded the current one. Under these conditions, *A. araucana* developed leaf anatomical features that ultimately resulted in a low stomatal conductance, with large stomatal size and low stomatal density compared to other extant gymnosperms (Table 1, Fig. S1), and even lower than many fossil araucarias and fossil gymnosperms (Fig. 2) (Barrera & Meza, 1991; Haworth *et al.*, 2011b; Xiong *et al.*, 2018). However, this comparison should be approached with caution, since most of the extant gymnosperms used in Fig. S1 were measured in herbarium leaves (Barrera & Meza, 1991). The leaves of *A. araucana* presented a notable wax accumulation (Fig. 1b), which further limits gas flow (CO<sub>2</sub> and water vapor) and increases the distance for CO<sub>2</sub> diffusion. Consequently, the  $g_{wmax}$  in *A. araucana* is notoriously lower than those values reported for other araucaria fossils (Table 1, Fig. 2b), though similar to most gymnosperms (Franks *et al.*, 2009; McElwain *et al.*, 2016; Xiong *et al.*, 2017). The difference between  $g_s$  and  $g_{wmax}$  is well documented in literature, with the *in vivo*  $g_s$  being approximately 20 to 25% lower than the theoretical one (Lawson & Morison, 2004; Dow *et al.*, 2014; Dow & Bergmann, 2014; McElwain *et al.*, 2016; Sack & Buckley, 2016). In the present study,  $g_{wmax}$  was 11-27 times higher than the  $g_s$  measured at both temperatures (Table 1, Table 3), surely due to presence of wax depositions, which can reduce the stomatal pore area by up to six times (Mohammadian *et al.*, 2007; Peguero-Pina *et al.*, 2016b). In the relationship between  $g_{wmax}$  and an atmospheric CO<sub>2</sub> concentration of 900 ppm, *A. araucana* values behave as an outlier of the general trend (Fig. 2b). This fact may be indicative of ancient stomatal traits which have evolved to changes in the atmospheric CO<sub>2</sub> concentration. However, this interpretation should be approached with caution, as the dimensions of the stomata at 900 ppm of CO<sub>2</sub> were not evaluated in this study.

During the transition from darkness to saturating light, we observed a first phase (for about 40 min after light was switched on) during which  $g_s$  increased from almost zero up to 0.0631 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, followed by a second phase of 80 min where  $g_s$  slowly increased to a steady-state of 0.074 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Fig. 3). Overall, *A. araucana*

necessitated more than 120 minutes to achieve maximum values of  $g_s$ , longer than required by other gymnosperms such as *Taxus baccata* and *Ginkgo biloba* (Xiong *et al.*, 2017, McAusland *et al.*, 2016). This slow response may be attributed again to primitive stomatal traits, since large and robust stomata found in this species are characterized by slow movements (Franks & Beerling, 2009; Raven, 2014).

Regarding to the CO<sub>2</sub> response, the stomata of *A. araucana* gradually closed as the CO<sub>2</sub> concentration increased (Fig. 3b). The low sensitivity may be due to the absence of the Ca<sup>2+</sup>-dependent signaling mechanism reported in modern species that increases the sensitivity of guard cells to CO<sub>2</sub> (Brodrribb & McAdam, 2013).

In *A. araucaria*, stomata were moderately sensitive to VPD variation between 1 and 2 kPa (Fig. 3c). This lower sensitivity may be associated with slow synthesis of the ABA, possibly caused by a lack of specific enzymes at the end of the ABA biosynthetic pathway, or a general delay in the up-regulation of critical ratelimiting enzymes for ABA biosynthesis (McAdam & Brodrribb, 2015). Therefore, the increase in foliar ABA levels in gymnosperms requires a long period of time (6 h) (McAdam & Brodrribb, 2016), in contrast to the shorter time required by angiosperms (10 to 20 min), than having a greater stomatal sensitivity to VPD (McAdam & Brodrribb, 2016; Sussmilch *et al.*, 2017). The slow synthesis of ABA is attributed to the fact that gymnosperms exhibit hydropassive responses, not mediated by ABA, to short-term changes in VPD (Brodrribb & McAdam, 2017). Therefore, considering that the movements of the stomata of *A. araucana* possibly follow a hydropassive model, the combination of a low leaf hydraulic conductance and high leaf capacitance found in this species (Brodrribb *et al.*, 2005), should promote extremely slow stomatal movements (Xiong & Nadal, 2020).

Overall, our results show that *A. araucana* displays and retains stomatal traits typical of evolutionarily ancient species (i.e.: low stomatal density, large stomata and slow changes of opening and closing of the stomata), despite the environmental conditions, in particular the atmospheric CO<sub>2</sub> concentration, have changed, suggesting poor plasticity and ability to adapt to new environments.

#### **4.2 Stomatal conductance is the main determinant of photosynthesis in *A. araucana* and the stomatal limitation increases with temperature**

The high light saturation point and the convexity of the A<sub>N</sub>-PAR curve suggests that *A. araucana* has an outstanding capacity to explore a wide PAR range (Fig. S3a,

Table 2), a strategy that is most likely related to its ability to regenerate under shady conditions and continue later growth under full irradiance conditions (Finckh & Paulsch, 1995; Lusk & Le-Quesne, 2000; González *et al.*, 2010).

Based on the evolutionary history of gymnosperms, it has been reported that they dominated much of the Mesozoic, and their greatest abundance occurred after the Permian-Triassic extinction, possibly due to the opening of the canopy to direct light (McElwain & Punyasena, 2007; Crisp & Cook, 2011; Wang & Ran, 2014). Many gymnosperms prefer sunny conditions (Kouřil *et al.*, 2016), though there are some species of Podocarpaceae with a significant tolerance to shade, allowing them to successfully compete with angiosperms (Biffin *et al.*, 2012; Brodribb *et al.*, 2012). Some conifers of the Taxaceae and Araucaraceae (Agathis) family are also able to compete with angiosperms by increasing their leaf area and colonizing semi-shady environments or those with direct sun exposure (Brodribb *et al.*, 2012). However, this is not the case of *A. araucana*, which has shown little competitive capacity, forming instead pure forests near the treeline (Veblen, 1982; Finckh & Paulsch, 1995; Panti *et al.*, 2012).

The optimal temperature for  $A_N$  was close to 20 °C (Fig. S3b, Table 2), which could indicate that the environmental temperature during the 15 years of growth in the nursery has allowed its optimum temperature to be adjusted to temperature similar to those of the warm temperate forests in summer (Jiménez-Castillo *et al.*, 2011; Urrutia-Estrada *et al.*, 2018). At light saturation and optimal temperature,  $A_N$  of *A. araucana* and its diffusive components (Fig. 5) were similar to those found in other gymnosperms (Peguero-Pina *et al.*, 2012; Peguero-Pina *et al.*, 2016a; Veromann-Jürgenson *et al.*, 2017; Xiong *et al.*, 2018; Veromann-Jürgenson *et al.*, 2020c). However, a notable effect of the leaf temperature was observed on  $A_N$ , being  $A_N$  decreased by almost half when measured at 25 °C as compared to 20 °C. This reduction in  $A_N$  was mainly attributable to  $g_{tot}$ , and particularly to  $g_s$  decrease, since  $g_m$  did not respond to temperature (Fig. 5, Table 3). The  $g_m$  response to temperature differs markedly between species, where a greater and/or lower sensitivity of  $g_m$  to temperature increase depends on the contributions of the activation energy for the CO<sub>2</sub> membrane permeability and the length of the effective path of CO<sub>2</sub> diffusion in the liquid phase (von Caemmerer & Evans, 2015). The drop in  $g_s$  could be explained by the increase in VPD (see materials and methods) as a result of the increase in leaf temperature, which could have caused the limitation of  $A_N$ . Despite the latter, the

primitive stomatal traits of *A. araucana* could possibly be responsible for the remarkably low  $g_s$ , directly limiting  $A_N$ . Indeed, the photosynthetic rates of  $CO_2$  assimilation and  $g_s$  of *A. araucana* at 25 °C were the lowest when compared with other gymnosperms, resulting in outlier values for  $g_m/g_s$  and  $A_N/g_s$  (Fig. 5), consistent with the higher intrinsic water use efficiency and  $\delta^{13}C$  foliar isotope content reported in gymnosperms (Smith & Epstein, 1971; Flexas & Carriqui, 2020). Although  $\delta^{13}C$  foliar has little association with plant phylogeny, particularly among spermatophytes, an increase of 1 to 2‰ has been reported in gymnosperms (Smith & Epstein, 1971; Arens *et al.*, 2000; Porter *et al.*, 2017), which has been attributed to greater water use efficiency.

The leaf mesophyll conductance for *A. araucana* modeled through anatomical parameters ( $g_m$ ) was among the lowest reported in gymnosperms (Veromann-Jürgenson *et al.*, 2020a). This is mainly due to the particular thickness of the cell wall ( $T_{cw}$ ), the second thickest reported for gymnosperms (Veromann-Jürgenson *et al.*, 2017; Veromann-Jürgenson *et al.*, 2020a). In *A. araucana*,  $T_{cw}$  limits the anatomical  $g_m$  by 87% (Table 5), notably higher than the percentage reported in *A. heterophylla* (Veromann-Jürgenson *et al.*, 2017). Furthermore, the low values of  $S_m/S$  and  $S_c/S$ , compared to other gymnosperms (Fig. 7b) (Veromann-Jürgenson *et al.*, 2020a), reveal that *A. araucana* is strongly limited by primitive leaf anatomical traits. The high correlation between LMA and  $T_{cw}$  (Fig. S6) suggests high density tissue, associated with a higher investment in  $T_{cw}$ . For other characteristics, *A. araucana* presents a similar pattern with other gymnosperms (Fig. 8), with thick and dense leaves and a low nitrogen (N) content per dry mass, most likely associated with a greater N allocation to the thick cell walls (Onoda *et al.*, 2017). All these traits are probably associated with the high leaf longevity reported in this species (24 years) (Lusk, 2001), and consequently determining one of the lowest anatomical  $g_m$  reported so far (Veromann-Jürgenson *et al.*, 2020a). The higher values of  $g_m$  determined *in vivo* through gas exchange and chlorophyll fluorescence could be a consequence of some adjustments that regulate  $CO_2$  diffusion, such as aquaporin and carbonic anhydrase (Momayyezi *et al.*, 2020). However, the regulatory components of  $g_m$  are still unknown in this species and should thus be addressed in future studies.

The increase in the measurement temperature (25 °C) exacerbated the biochemical limitations by 36% (Table 3). This is supported by the coordinated decrease in the maximum Rubisco carboxylation rate ( $V_{cmax}$ ) and the electron

transport rate (ETR) (Table 3). The reduction of  $A_N$  has also been observed in other species, where the increase in temperature could negatively affect the regeneration capacity of ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) or the activation state of Rubisco (Cen & Sage, 2005). In fact, the ETR has been found to exhibit an optimum temperature identical to photosynthesis (Table 3), indicating that the regeneration capacity of RuBP above the optimum temperature may be the main limitation of  $A_N$  (Sage *et al.*, 1995).

### 4.3 Evolutionarily ancient Rubisco kinetic traits

Although the photosynthetic limitation of basal groups has been evaluated mainly based on diffusive and structural factors in gymnosperms (Franks & Beerling, 2009; Franks *et al.*, 2014; Veromann-Jürgenson *et al.*, 2017; Gago *et al.*, 2019; Flexas & Carriquí, 2020; Veromann-Jürgenson *et al.*, 2020a), the study of the kinetic characteristics of Rubisco has been scarcely addressed (Yeoh *et al.*, 1981; Bird *et al.*, 1982; Galmés *et al.*, 2014; Iguíñez *et al.*, 2020; Miyazawa *et al.*, 2020). In this sense, the present results make a valuable contribution to understanding the kinetic traits of Rubisco of one of the most primitive members of the gymnosperm families.

It has been suggested that Araucariaceae was diverse and widespread during the Jurassic (Miller, 1977). The separation of the supercontinent Pangea could have been an important geological event in the distribution of *A. araucana* in the Southern Hemisphere (Stockey, 1982; Holz, 2015), where climatic conditions, characterized by higher environmental humidity, warmer temperatures (Kershaw & Wagstaff, 2001; Sellwood & Valdes, 2006; Harris *et al.*, 2017), and higher carbon concentrations, were drivers of the greater expansion of the Araucariaceae (Sellwood & Valdes, 2006). Our results assume that the high atmospheric concentrations of CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> at the geological time of the diversification of *A. araucana* (Stockey, 1982; 1994; Berner, 2006; Kunzmann, 2007; Holz, 2015; Krause *et al.*, 2018) influenced its Rubisco kinetics, as reported to other living fossils (Galmés *et al.*, 2014). For instance,  $K_c$  of *A. araucana* showed values close to other ancient species, such as *Metasequoia glyptostroboides*, *Ginkgo biloba*, and *Atrichum undulatum* (Galmés *et al.*, 2014; Miyazawa *et al.*, 2020). Likewise, the  $K_o$  was surprisingly high (Fig. S5a). In addition, the slow rates of  $k_{cat}^c$ , along with the low affinity for CO<sub>2</sub>, resulted in a low Rubisco catalytic efficiency of carboxylation ( $k_{cat}^c/K_c$ ), among the lowest values reported to date in higher plants (Iñíguez *et al.*, 2020). Overall, the

atmospheric conditions that governed the evolution of this species could be responsible for the conservation of primitive structural and biochemical traits that have determined photosynthetic rates typical of evolutionarily ancient species.

## CONCLUDING REMARKS AND PROSPECTS

The present study provides novel information on the photosynthetic performance, anatomical and biochemical traits of *A. araucana*, one of the species that belongs to the most primitive gymnosperm families.

The anatomical traits of the stomatal apparatus and the internal leaf mesophyll caused a notably low  $g_s$ , even lower than theoretical conductance. These traits proved to be responsible for the slow stomatal response to changes in environmental conditions. Thus,  $g_s$  strongly determines the photosynthetic rates, relegating  $g_m$  to a less determinant component, despite the remarkably high values of  $T_{cw}$  and low values of  $S_c/S$  and  $S_m/S$  found in this species. However, interestingly, the quantitative analysis shows that  $A_N$  is equally limited by both diffusive and biochemical components. The increase in the measurement temperature induced increases in stomatal and biochemical limitations that resulted in a notable decrease in the photosynthetic rate. *A. araucana* preserves primitive Rubisco kinetic traits, probably as a result of the environmental conditions at the time of its diversification, which are in conjunction with  $g_s$ , and determined its photosynthetic performance.

The results of this study are of great interest especially now that climate change has caused a high percentage of mortality in different forest biomes. Therefore, according to our results, climate change, associated with the increase in temperature may cause a notorious drop in stomatal conductance, hindering the diffusion of carbon into intercellular air spaces, which together with a lower Rubisco affinity for  $CO_2$  may compromise the photosynthetic capacity of *A. araucana*.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by The National Fund for Scientific and Technological Development (FONDECYT 1191382). B.K.R. acknowledge funds from CONICYT Magister scholarship. J.G. was supported by the Spanish Ministry of Sciences, Innovation and Universities, the Spanish State Research Agency and the European

Regional Development Funds (project grant PGC2018-094621-B-I00). C.I. was supported by a post-doctoral grant from the Government of the Balearic Islands.





## REFERENCES

- Aguilera-Betti I, Muñoz AA, Stahle D, et al.** 2017. The first millennium-age *Araucaria araucana* in Patagonia. *Tree-Ring Research* 73, 53-56.
- Arens NC, Jahren AH, Amundson R.** 2000. Can C<sub>3</sub> plants faithfully record the carbon isotopic composition of atmospheric carbon dioxide? *Paleobiology* 26, 137-164.
- Balocchi F, Wingfield MJ, Ahumada R, et al.** 2021. *Pewenomyces kutranfy* gen. nov. et sp. nov. causal agent of an important canker disease on *Araucaria araucana* in Chile. *Plant Pathology* 70, 1243-1259.
- Barrera E, Meza I.** 1991. Foliar epidermal characteristics of Chilean Gymnosperms. *Boletín Museo Nacional de Historia Natural* 42, 25-37.
- Bernacchi CJ, Singaas EL, Pimentel C, et al.** 2001. Improved temperature response functions for models of Rubisco-limited photosynthesis. *Plant, Cell & Environment* 24, 253-259.
- Berner RA.** 2006. Geocarbsulf: a combined model for Phanerozoic atmospheric O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>. *Geochimica Cosmochimica Acta* 70, 5653-5664.
- Biffin E, Brodribb TJ, Hill RS, et al.** 2012. Leaf evolution in Southern Hemisphere conifers tracks the angiosperm ecological radiation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279, 341-348.
- Bird IF, Cornelius MJ, Keys AJ.** 1982. Affinity of RuBP carboxylases for carbon dioxide and inhibition of the enzymes by oxygen. *Journal of Experimental Botany* 33, 1004-1013.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brodribb TJ, Holbrook NM, Zwieniecki MA, et al.** 2005. Leaf hydraulic capacity in ferns, conifers and angiosperms: impacts on photosynthetic maxima. *New Phytologist* 165, 839-846.
- Brodribb TJ, McAdam SA.** 2013. Unique responsiveness of angiosperm stomata to elevated CO<sub>2</sub> explained by calcium signalling. *PLoS One* 8, e82057.
- Brodribb TJ, McAdam SA.** 2017. Evolution of the stomatal regulation of plant water content. *Plant Physiology* 174, 639-649.

- Brodribb TJ, Pittermann J, Coomes DA.** 2012. Elegance versus speed: examining the competition between conifer and angiosperm trees. *International Journal of Plant Sciences* 173, 673-694.
- Brooks A, Farquhar GD.** 1985. Effect of temperature on the CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. *Planta* 165, 397-406.
- Carriquí M, Cabrera HM, Conesab MÀ, et al.** 2015. Diffusional limitations explain the lower photosynthetic capacity of ferns as compared with angiosperms in a common garden study. *Plant, Cell & Environment* 38, 448-460.
- Cen YP, Sage RF.** 2005. The regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in response to variation in temperature and atmospheric CO<sub>2</sub> partial pressure in sweet potato. *Plant Physiology* 139, 1-12.
- Crisp MD, Cook LG.** 2011. Cenozoic extinctions account for the low diversity of extant gymnosperms compared with angiosperms. *New Phytologist* 192, 997-1009.
- De Strittmatter CD.** 1973. Nueva técnica de diafanización. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 15, 126-129.
- Dettmann ME, Clifford HT.** 2005. Biogeography of Araucariaceae. Australia and New Zealand forest histories: araucarian forests. *Australian Forest History Society Inc. Occasional Publication* 2, 1-9.
- Dow GJ, Bergmann DC.** 2014. Patterning and processes: how stomatal development defines physiological potential. *Current Opinion in Plant Biology* 21, 67-74.
- Dow GJ, Berry JA, Bergmann DC.** 2014. The physiological importance of developmental mechanisms that enforce proper stomatal spacing in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 201, 1205-1217.
- Escapa IH, Catalano SA.** 2013. Phylogenetic analysis of Araucariaceae: integrating molecules, morphology, and fossils. *International Journal of Plant Sciences* 174, 1153-1170.
- Farquhar G, Von Caemmerer S, Berry J.** 1980. A biochemical-model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta* 149, 78-90.
- Finckh MA, Paulsch A.** 1995. The ecological strategy of *Araucaria araucana*. *Flora* 190, 365-382.

- Flexas J, Carriquí M.** 2020. Photosynthesis and photosynthetic efficiencies along the terrestrial plant's phylogeny: Lessons for improving crop photosynthesis. *The Plant Journal* 101, 964-978.
- Flexas J, Díaz-Espejo A, Berry JA, et al.** 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, 1533-1543.
- Franks PJ, Beerling DJ.** 2009. Maximum leaf conductance driven by CO<sub>2</sub> effects on stomatal size and density over geologic time. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 10343-10347.
- Franks PJ, Drake PL, Beerling DJ.** 2009. Plasticity in maximum stomatal conductance constrained by negative correlation between stomatal size and density: an analysis using *Eucalyptus globulus*. *Plant, Cell & Environment* 32, 1737-1748.
- Franks PJ, Farquhar GD.** 2001. The effect of exogenous abscisic acid on stomatal development, stomatal mechanics, and leaf gas exchange in *Tradescantia virginiana*. *Plant Physiology* 125, 935-942.
- Franks PJ, Royer DL, Beerling DJ, et al.** 2014. New constraints on atmospheric CO<sub>2</sub> concentration for the Phanerozoic. *Geophysical Research Letters* 41, 4685-4694.
- Gago J, Carriquí M, Nadal M, et al.** 2019. Photosynthesis optimized across land plant phylogeny. *Trends in Plant Science* 24, 947-958.
- Galmés J, Conesa MA, Ochogavía JM, et al.** 2011. Physiological and morphological adaptations in relation to water use efficiency in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*. *Plant, Cell & Environment* 34, 245-260.
- Galmés J, Kapralov M, Andralojc P, et al.** 2014. Expanding knowledge of the Rubisco kinetics variability in plant species: environmental and evolutionary trends. *Plant, Cell & Environment* 37, 1989-2001.
- Galmés J, Ochogavía JM, Gago J, et al.** 2013. Leaf responses to drought stress in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*: anatomical adaptations in relation to gas exchange parameters. *Plant, Cell & Environment* 36, 920-935.

- Gensel PG.** 2008. The earliest land plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 39, 459-477.
- González ME, Veblen TT, Sibold JS.** 2010. Influence of fire severity on stand development of *Araucaria araucana*–*Nothofagus pumilio* stands in the Andean cordillera of south-central Chile. *Austral Ecology* 35, 597-615.
- Grassi G, 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 & Environment* 28, 834-849.
- Harley PC, Loreto F, Di Marco G, et al.** 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.
- Harris R, McCall R, Randall O, et al.** 2017. Climate change during the Triassic and Jurassic. *Geology Today* 33, 210-215.
- Hasper TB, Dusenge ME, Breuer F, et al.** 2017. Stomatal CO<sub>2</sub> responsiveness and photosynthetic capacity of tropical woody species in relation to taxonomy and functional traits. *Oecologia* 184, 43-57.
- Haworth M, Elliott-Kingston C, McElwain JC.** 2011a. Stomatal control as a driver of plant evolution. *Journal of Experimental Botany* 62, 2419-2423.
- Haworth M, Elliott-Kingston C, McElwain JC.** 2011b. The stomatal CO<sub>2</sub> proxy does not saturate at high atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations: evidence from stomatal index responses of Araucariaceae conifers. *Oecologia* 167, 11-19.
- Hill RS, Brodribb TJ.** 1999. Turner Review No. 2-Southern conifers in time and space. *Australian Journal of Botany* 47, 639-696.
- Holz M.** 2015. Mesozoic paleogeography and paleoclimates a discussion of the diverse greenhouse and hothouse conditions of an alien world. *Journal of South American Earth Sciences* 61, 91-107.
- Iñiguez C, Capó-Bauçà S, Niinemets Ü, et al.** 2020. Evolutionary trends in Rubisco kinetics and their co-evolution with CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms. *The Plant Journal* 101, 897-918.
- Iñiguez C, Galmés J, Gordillo FJL.** 2019. Rubisco carboxylation kinetics and inorganic carbon utilization in polar versus cold-temperate seaweeds. *Journal of Experimental Botany* 70, 1283-1297.
- Jiménez-Castillo M, Lobos-Catalán P, Aguilera-Betti I, et al.** 2011. Daily transpiration rates and hydraulic relationships in tree species with different

shade-tolerance level in a Chilean temperate forest. *Gayana Botanica* 68, 155-162.

- Kane HJ, Viil J, Entsch B, et al.** 1994. An improved method for measuring the CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of ribulosebiphosphate carboxylase-oxygenase. *Functional Plant Biology* 1, 449-461.
- Kershaw P, Wagstaff B.** 2001. The southern conifer family *Araucariaceae*: history, status, and value for paleoenvironmental reconstruction. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32, 397-414.
- Kouřil R, Nosek L, Bartoš J, et al.** 2016. Evolutionary loss of light-harvesting proteins Lhcb6 and Lhcb3 in major land plant groups—break-up of current dogma. *New Phytologist* 210, 808-814.
- Krause AJ, Mills BJ, Zhang S, et al.** 2018. Stepwise oxygenation of the Paleozoic atmosphere. *Nature Communications* 9, 1-10.
- Kroner Y, Way DA.** 2016. Carbon fluxes acclimate more strongly to elevated growth temperatures than to elevated CO<sub>2</sub> concentrations in a northern conifer. *Global Change Biology* 22, 2913-2928.
- Kunzmann L.** 2007. Araucariaceae (Pinopsida): aspects in palaeobiogeography and palaeobiodiversity in the Mesozoic. *Zoologischer Anzeiger* 246, 257-277.
- Lambers H, Chapin FS, Pons TL.** 2008. *Plant physiological ecology*, 2nd edn. New York: Springer Verlag.
- Lawson T, Morison JIL.** 2004. Stomatal function and Physiology. In: Hemsley AR, Poole I, eds. *The evolution of plant physiology; from whole plants to ecosystem*. Cambridge, UK: Elsevier Academic Press, 217–242.
- Lobo FDA, De Barros MP, Dalmagro HJ, et al.** 2013. Fitting net photosynthetic light-response curves with Microsoft Excel a critical look at the models. *Photosynthetica* 51, 445-456.
- Lusk C, Le-Quesne C.** 2000. Branch whorls of juveniles *Araucaria araucana* (Molina) Koch: are they formed annually. *Revista Chilena de Historia Natural* 73, 497-502.
- Lusk CH.** 2001. Leaf life spans of some conifers of the temperate forests of South America. *Revista Chilena de Historia Natural* 74, 711-718.
- Manter DK, Kerrigan J.** 2004. A/C<sub>i</sub> curve analysis across a range of woody plant species: influence of regression analysis parameters and mesophyll conductance. *Journal of Experimental Botany* 55, 2581-2588.

- Martín MA, Mattioni C, Lusini I, et al.** 2014. New insights into the genetic structure of *Araucaria araucana* forests based on molecular and historic evidences. *Tree Genetics & Genomes* 10, 839-851.
- McAdam SA, Brodribb TJ.** 2015. The evolution of mechanisms driving the stomatal response to vapor pressure deficit. *Plant Physiology* 167, 833-843.
- McAdam SA, Brodribb TJ.** 2016. Linking turgor with ABA biosynthesis: implications for stomatal responses to vapor pressure deficit across land plants. *Plant Physiology* 171, 2008-2016.
- McAusland L, Vialet-Chabrand S, Davey P, et al.** 2016. Effects of kinetics of light-induced stomatal responses on photosynthesis and water-use efficiency. *New Phytologist* 211, 1209-1220.
- McElwain JC, Punyasena SW.** 2007. Mass extinction events and the plant fossil record. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 548-557.
- McElwain JC, Yiotis C, Lawson T.** 2016. Using modern plant trait relationships between observed and theoretical maximum stomatal conductance and vein density to examine patterns of plant macroevolution. *New Phytologist* 209, 94-103.
- Miller CN.** 1977. Mesozoic conifers. *The Botanical Review* 43, 217-280.
- Miyazawa SI, Tobita H, Ujino-Ihara T, et al.** 2020. Oxygen response of leaf CO<sub>2</sub> compensation points used to determine Rubisco specificity factors of gymnosperm species. *Journal of Plant Research* 133, 205-215.
- Mohammadian MA, Watling JR, Hill RS.** 2007. Do waxy stomatal plugs impact leaf gas exchange in a rain forest gymnosperm *Agathis robusta*. *General and Applied Plant Physiology* 33, 203-220.
- Momayyezi M, McKown AD, Bell SC, et al.** 2020. Emerging roles for carbonic anhydrase in mesophyll conductance and photosynthesis. *The Plant Journal* 101, 831-844.
- Montgomery RB.** 1947. Viscosity and thermal conductivity of air and diffusivity of water vapor in air. *Journal of Meteorology* 4, 193-196.
- Niinemets Ü, Kull O, Tenhunen JD.** 1999. Variability in leaf morphology and chemical composition as a function of canopy light environment in coexisting deciduous trees. *International Journal of Plant Sciences* 160, 837-848



- Niinemets Ü, Reichstein M.** 2003. Controls on the emission of plant volatiles through stomata: a sensitivity analysis. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 108, 4211.
- Niinemets Ü.** 1999. Components of leaf dry mass per area-thickness and density-alter leaf photosynthetic capacity in reverse directions in woody plants. *New Phytologist* 144, 35-47.
- Ojeda C, Espinosa L, Roig F.** 2017. Efectos del cambio climático en las hojas de *Araucaria araucana*. *Instituto Argentino de Nivología, Glaciología y Ciencias Ambientales*, Universitarios Potosinos.
- Onoda Y, Wright IJ, Evans JR, et al.** 2017. Physiological and structural tradeoffs underlying the leaf economics spectrum. *New Phytologist* 214, 1447-1463.
- Panti C, Pujana RR, Zamaloa MC, et al.** 2012. Araucariaceae macrofossil record from South America and Antarctica. *Alcheringa: An Australasian Journal of Palaeontology* 36, 1-22.
- Peguero-Pina JJ, Flexas J, Galmés J, et al.** 2012. Leaf anatomical properties in relation to differences in mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> and photosynthesis in two related Mediterranean *Abies* species. *Plant, Cell & Environment* 35, 2121-2129.
- Peguero-Pina JJ, Sancho-Knapik D, Flexas J, et al.** 2016a. Light acclimation of photosynthesis in two closely related firs (*Abies pinsapo* Boiss. and *Abies alba* Mill.): the role of leaf anatomy and mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>. *Tree Physiology* 36, 300-310.
- Peguero-Pina JJ, Sisó S, Fernández-Marín B, et al.** 2016b. Leaf functional plasticity decreases the water consumption without further consequences for carbon uptake in *Quercus coccifera* L. under Mediterranean conditions. *Tree Physiology* 36, 356-367.
- Porter AS, Yiotis C, Montañez IP, et al.** 2017. Evolutionary differences in  $\Delta^{13}\text{C}$  detected between spore and seed bearing plants following exposure to a range of atmospheric O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> ratios; implications for paleoatmosphere reconstruction. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 213, 517-533.
- Raven JA.** 2014. Speedy small stomata? *Journal of Experimental Botany* 65, 1415-1424.
- Sack L, Buckley TN.** 2016. The developmental basis of stomatal density and flux. *Plant Physiology* 171, 2358-2363.



- Sage RF, Santrucek J, Grise DJ.** 1995. Temperature effects on the photosynthetic response of C<sub>3</sub> plants to long-term CO<sub>2</sub> enrichment. *Vegetatio* 121, 67-77.
- Sellwood BW, Valdes PJ.** 2006. Mesozoic climates: General circulation models and the rock record. *Sedimentary Geology* 190, 269-287.
- Setoguchi H, Asakawa Osawa T, Pintaud JC, et al.** 1998. Phylogenetic relationships within Araucariaceae based on rbcL gene sequences. *American journal of botany* 85, 1507-1511.
- Smith BN, Epstein S.** 1971. Two categories of <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ratios for higher plants. *Plant Physiology* 47, 380-384.
- Steinhorsdottir M, Vajda V.** 2015. Early Jurassic (late Pliensbachian) CO<sub>2</sub> concentrations based on stomatal analysis of fossil conifer leaves from eastern Australia. *Gondwana Research* 27, 932-939.
- Stockey R.** 1982. The Araucariaceae: an evolutionary perspective. *Review of Palaeobotany and Palynology* 37, 133-154.
- Stockey R.** 1994. Mesozoic Araucariaceae: morphology and systematic relationships. *Journal of Plant Research* 107, 493-502.
- Sussmilch FC, Brodribb TJ, McAdam SA.** 2017. What are the evolutionary origins of stomatal responses to abscisic acid in land plants? *Journal of Integrative Plant Biology* 59, 240-260.
- Tomás M, Flexas J, Copolovici L, et al.** 2013. Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO<sub>2</sub> across species: quantitative limitations and scaling up by models. *Journal of Experimental Botany* 64, 2269-2281.
- Urrutia-Estrada J, Fuentes-Ramírez A, Hauenstein E.** 2018. Differences in floristic composition of Araucaria-Nothofagus forests affected by mixed levels of fire severity. *Gayana Botánica* 75, 625-638.
- Veblen TT.** 1982. Regeneration Patterns in *Araucaria araucana* Forests in Chile. *Journal of Biogeography* 9, 11-28.
- Veromann-Jürgenson LL, Tosens T, Laanisto L, et al.** 2017. Extremely thick cell walls and low mesophyll conductance: welcome to the world of ancient living! *Journal of Experimental Botany* 68, 1639-1653.
- Veromann-Jürgenson LL, Brodribb TJ, Niinemets Ü, et al.** 2020a. Variability in the chloroplast area lining the intercellular airspace and cell walls drives

mesophyll conductance in gymnosperms. *Journal of Experimental Botany* 71, 4958-4971.

**Veromann-Jürgenson LL, Brodribb TJ, Niinemets Ü, et al.** 2020c. Pivotal role of mesophyll conductance in shaping photosynthetic performance across 67 structurally diverse gymnosperm species. *International Journal of Plant Sciences* 181, 116-128.

**von Caemmerer S, Evans JR.** 2015. Temperature responses of mesophyll conductance differ greatly between species. *Plant, Cell & Environment* 38, 629-637.

**Wang XQ, Ran JH.** 2014. Evolution and biogeography of gymnosperms. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 75, 24-40.

**Wright IJ, Groom PK, Lamont BB, et al.** 2004. Leaf trait relationships in Australian plant species. *Functional Plant Biology* 31, 551-558.

**Xiong D, Flexas J, Yu T, et al.** 2017. Leaf anatomy mediates coordination of leaf hydraulic conductance and mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> in *Oryza*. *New Phytologist* 213, 572-583.

**Xiong D, Douthe C, Flexas J.** 2018. Differential coordination of stomatal conductance, mesophyll conductance, and leaf hydraulic conductance in response to changing light across species. *Plant, Cell & Environment* 41, 436-450.

**Xiong D, Nadal M.** 2020. Linking water relations and hydraulics with photosynthesis. *The Plant Journal* 101, 800-815.

**Yeoh HH, Badger MR, Watson L.** 1981. Variations in kinetic properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylases among plants. *Plant Physiology* 67, 1151-1155.

## VI. DISCUSIÓN GENERAL

La magnitud de los cambios reportados durante los últimos 170 años en el sistema climático no ha tenido precedentes desde hace miles de años. El cambio climático inducido por el hombre ha contribuido al aumento en 1,1 °C de la temperatura de la superficie terrestre, la cual, según predicciones recientes seguirá incrementando hasta al menos mediados del siglo XXI (IPCC, 2021). Las consecuencias actuales de esto se observan en diversas regiones del mundo, en una mayor frecuencia e intensidad de olas de calor, cambios en las precipitaciones, eventos de sequía y subsecuente mortalidad regresiva de bosques (McDowell *et al.*, 2016; Stoval *et al.*, 2019; IPCC, 2021). Si bien, se prevé que los eventos de mortalidad forestal aumenten con el cambio climático, actualmente tenemos relativamente poco conocimiento sobre cómo los árboles sucumben a la sequía (Anderegg & Anderegg, 2013). En este sentido, integrar parámetros determinantes de los procesos fotosintéticos e hidráulicos, sería un aporte valioso en el estudio de las respuestas biológicas frente a cambio climático. El intercambio de gases integra una serie de componentes limitantes a través de reducciones en los parámetros difusivos de CO<sub>2</sub> y/o daño bioquímico en el proceso de fijación de CO<sub>2</sub>, por lo cual, abordar en estas limitantes permitiría predecir y comprender en profundidad los rasgos fisiológicos subyacentes a la mortalidad por sequía. Las hojas de los árboles son consideradas el órgano distal más susceptible a presentar daño por sequía, por lo cual, integrar la conductancia hidráulica foliar junto a sus componentes xilemáticos y extraxilemáticos podría constituir un factor preventivo de mortalidad más directo que la falla hidráulica del tallo (Choat, 2013).

En el caso de *A. araucana*, el alto porcentaje de mortalidad observado en los últimos años, ha sido atribuido principalmente a un deterioro metabólico producto de las condiciones anormales, particularmente, a eventos extremos de sequía (Easterling *et al.*, 2000; CONAF, 2018; Vélez *et al.*, 2018; Garreaud *et al.*, 2020; Pastorino & Marchelli, 2021). A pesar del escaso estudio de los mecanismos subyacentes a la mortalidad en esta especie, la investigación realizada por Puchi *et al.* (2021), a lo largo de un gradiente de precipitación entre Chile y Argentina, nos otorga conocimiento base a esta interrogante. El control estomático es considerado un indicador importante de la variación estratégica de la fisiología del estrés ante la sequía (Zimmer *et al.*, 2016), en este sentido, las distintas poblaciones de araucaria

evaluadas con algún grado de daño foliar presentaron estrategias estomáticas contrastantes. En la cordillera de la Costa, seca y calida, y Cordillera de los Andes Chilena, con menor precipitaciones que la Cordillera de los Andes Argentino, desplegaron un comportamiento isohídrico, cerrando sus estomas ante el menor porcentaje de precipitación y restringiendo el intercambio de gases para limitar la tensión del xilema a medida que disminuye la disponibilidad de agua. Sin embargo, las plantas presentaron un deterioro hidráulico y disminución del crecimiento en los árboles dañados. Por el contrario, en la Cordillera de los Andes en el sector Argentino, fría y húmeda, las plantas no cierran sus estomas y son capaces de mantener inversiones de carbono en las paredes celulares de las traqueidas, lo que se asocio a mayores tasas de asimilación de carbono. A pesar de las distintas estrategias, las plantas convergen en una misma respuesta al reducir la conductancia hidráulica teórica y el crecimiento radial, lo que sugeriría que las plantas con daño foliar han estado sometidas a un proceso prolongado de deterioro hidráulico. En general, este estudio demuestra que árboles de una misma especie pueden desplegar distintos mecanismos de mortalidad en base a cambios en las condiciones de sitio, información útil para integrar en futuros estudios (Puchi *et al.*, 2021).

El estudio de los rasgos fisiológicos y morfológicos foliares es un paso clave para entender la historia evolutiva de las especies vegetales, y comprender cómo las especies evolutivamente antiguas han podido subsistir en la Tierra por millones de años, y qué respuestas tendrán frente al cambio climático. Para poder responder, en parte, a estas preguntas nos centramos en caracterizar los rasgos fotosintéticos, anatómicos foliar y bioquímicos de Rubisco de la icónica, ancestral y amenazada especie de conífera, *A. araucana*. En base a los rasgos anatómicos de sus estomas, es destacable mencionar que esta especie presenta tamaño de estomas y densidad estomática con valores extremos entre las gimnospermas y araucarias fósiles (Franks & Beerling, 2009; Franks *et al.*, 2014), los cuales resultan en conductancias estomáticas y respuestas estomáticas notablemente bajas frente a cambios en las variaciones ambientales. Al integrar los parámetros estructurales del mesófilo, *A. araucana* destaca con los valores de  $g_m$  más bajos reportados para gimnospermas, posición otorgada por una gruesa pared celular y una baja área de superficie de cloroplasto expuesta al espacio aéreo intercelular que limita fuertemente la difusión del CO<sub>2</sub> dentro de la lamina foliar (Onoda *et al.*, 2017; Gago *et al.*, 2019; Veromann-Jürgenson *et al.*, 2020a). Sin embargo, dentro de las limitaciones de la

fotosíntesis, la conductancia estomática y los rasgos bioquímicos de Rubisco suman protagonismo, las cuales se condicen con la robustez y lentitud de los estomas, y los primitivos rasgos cinéticos de Rubisco. En estos últimos, araucaria se destaca por presentar una de las eficiencias catalíticas de carboxilación de Rubisco ( $k_{cat}^c / K_c$ ) más bajas reportada para plantas superiores, siendo estas características originadas posiblemente bajo la presión selectiva de una alta concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico al momento de su evolución (Stockey, 1982). Dentro de los rasgos estructurales, la estrecha relación entre LMA y el grosor de la pared celular dan indicios de una alta densidad foliar asociada a una mayor inversión de nitrógeno en la pared celular, siendo estos rasgos probablemente asociados a la alta longevidad de las hojas reportada en esta especie (Lusk, 2001; Onoda *et al.*, 2017). Es probable que estas características, en un ambiente gobernado por altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, hayan permitido a araucaria alcanzar tasas fotosintéticas mayores a las actuales, explicando posiblemente su extensa distribución durante la Era Mesozoica (Stockey, 1982, 1994; Berner, 2006; Kunzmann, 2007; Holz, 2015; Krause *et al.*, 2018).

En base a la caracterización fisiología aquí presentada, es difícil concluir qué rasgos le han permitido a araucaria colonizar la Tierra por millones de años. Sin embargo, indagar en los atributos funcionales de las Araucariaceae podría dar luces del éxito de esta familia en el hemisferio sur. Un rasgo claro en las Araucariaceae es la baja tolerancia al estrés hídrico. Brodribb *et al.* (2005); Brodribb *et al.* (2014); Zimmer *et al.* (2016), reportaron en *A. araucana* una baja conductancia hidráulica de la hoja y un potencial hídrico de pérdida de un 50% de la conductividad hidráulica de -1,96 MPa, valor superior a los bajos potenciales hídricos de especies resistentes a la sequía. Así, es probable que la baja tolerancia a la menor disponibilidad de agua la haya llevado a habitar ambientes húmedos y mesotérmicos, en los cuales modificaciones en la densidad de la madera, han sido prerrequisito para mantener bajas tasas de crecimiento y costos respiratorios, y así mantenerse en el bosque del hemisferio sur por millones de años (Brodribb *et al.*, 2012). La alta densidad de la madera y la inversión de un sistema de canales de resina rica en terpenos son útiles en especies longevas para evitar la descomposición por agentes microbianos y fúngicos dominantes en un ambiente más húmedo (Pittermann *et al.*, 2006; Brodribb *et al.*, 2012). Otro atributo es la mayor inversión estructural en hojas para proteger el fuste de incendios esporádicos y actividad volcánica, estrategia necesaria para abrir el dosel y permitir la regeneración de esta especie intolerante a la sombra (Díaz-Vaz,

1984; Souza *et al.*, 2021), característica ecológica que podría explicar la formación de bosques emergentes puros y mixtos, con una mínima competencia por la luz.

Finalmente, en base a la información recopilada en la revisión bibliográfica y lo obtenido en nuestro estudio de caracterización, es posible sugerir que araucaria ha permanecido a lo largo de la historia evolutiva gracias a sus atributos funcionales, los que le han permitido colonizar bosques méxicos pobres en nutrientes, no atractivos para la mayoría de las angiospermas, con el fin de evitar la competencia por la luz. Sin embargo, incluso las condiciones de esos ambientes, se han visto afectadas en las últimas décadas por el aumento de temperatura y la reducción en la disponibilidad hídrica, lo que podría restringir aún más la fotosíntesis ante mayor limitación estomática y bioquímica, y que junto a un sistema hidráulico intolerante a la sequía, podría provocar debilitamiento metabólico, haciéndola más susceptible al ataque de patógenos, lo que posteriormente desencadenaría la muerte regresiva de esta icónica especie.



## VII. CONCLUSIONES GENERALES

Se presenta una visión actual de la incidencia de mortalidad en los bosques de coníferas a nivel mundial y cómo la evolución de los rasgos morfofisiológicos primitivos pueden penalizar severamente la asimilación de carbono pasando de una difusión limitada del CO<sub>2</sub> a un deterioro metabólico, provocando potencialmente la muerte de la planta.

Los rasgos anatómicos de los estomas de *A. araucana* se posicionan entre los valores más bajos dentro de las gimnospermas fósiles y no fósiles, determinando una reducida conductancia estomática y respuestas notablemente lentas de los estomas frente a cambios en las condiciones ambientales.

Al comparar con otras gimnospermas, *A. araucana* despliega bajas tasas fotosintéticas y conductancias estomáticas, logrando una mayor eficiencia en el uso del agua, acentuando estas diferencias al incrementar la temperatura.

*A. araucana* está fuertemente limitada por los rasgos anatómicos de sus hojas primitivas, las cuales, dentro de las gimnospermas, presentan uno de los espesores más altos de pared celular y una baja área de superficie de cloroplasto expuesta al espacio aéreo intercelular, determinando una de las conductancias del mesófilo anatómicas más bajas reportadas hasta el momento.

La fotosíntesis de *A. araucana* se encuentra colimitada por los componentes difusivos y bioquímicos y, ante aumentos en la temperatura de medición, las limitantes estomáticas y bioquímicas reducen a la mitad la asimilación de carbono.

*A. araucana* presenta una baja afinidad de Rubisco por el O<sub>2</sub> y una afinidad por el CO<sub>2</sub> similar a otras especies antiguas, siendo este último, junto a las lentas tasas de  $k_{cat}^c$ , los responsables de la baja eficiencia catalítica de carboxilación de Rubisco ( $k_{cat}^c / K_c$ ), posicionándose entre los valores más bajos reportados hasta la fecha en plantas superiores.



Es probable que los rasgos presentes en *A. araucana* sean resultado de las condiciones atmosféricas que gobernaron su evolución, los cuales frente a cambios en las condiciones ambientales, específicamente aumento de temperatura, pueden provocar una caída notoria de la conductancia estomática, lo que en conjunto con una menor afinidad de Rubisco por CO<sub>2</sub> pueden alterar drásticamente la capacidad fotosintética de esta especie, aumentando su probabilidad de muerte asociada a cambio climático.



## REFERENCIAS

- Allen CD, Breshears DD, McDowell NG.** 2015. On underestimation of global vulnerability to tree mortality and forest die-off from hotter drought in the Anthropocene. *Ecosphere* 6, 1-55.
- Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, et al.** 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management* 259, 660-684.
- Anderegg WR, Anderegg LD.** 2013. Hydraulic and carbohydrate changes in experimental drought-induced mortality of saplings in two conifer species. *Tree Physiology* 3, 252-260.
- Balocchi F, Wingfield MJ, Ahumada R, et al.** 2021. *Pewenomyces kutranfy* gen. nov. et sp. nov. causal agent of an important canker disease on *Araucaria araucana* in Chile. *Plant Pathology* 70, 1243-1259.
- Berner RA.** 2006. Geocarbsulf: a combined model for Phanerozoic atmospheric O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>. *Geochimica Cosmochimica Acta* 70, 5653-5664.
- Brodribb TJ, Feild TS.** 2010. Leaf hydraulic evolution led a surge in leaf photosynthetic capacity during early angiosperm diversification. *Ecology letters* 13, 175-183.
- Brodribb TJ, Holbrook NM, Zwieniecki MA, et al.** 2005. Leaf hydraulic capacity in ferns, conifers and angiosperms: impacts on photosynthetic maxima. *New Phytologist* 165, 839-846.
- Brodribb TJ, McAdam SA, Jordan GJ, et al.** 2014. Conifer species adapt to low-rainfall climates by following one of two divergent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 14489-14493.
- Brodribb TJ, Pittermann J, Coomes DA.** 2012. Elegance versus speed: examining the competition between conifer and angiosperm trees. *International Journal of Plant Sciences* 173, 673-694.
- Carriquí M, Cabrera HM, Conesab MÀ, et al.** 2015. Diffusional limitations explain the lower photosynthetic capacity of ferns as compared with angiosperms in a common garden study. *Plant, Cell & Environment* 38, 448-460.
- Choat B.** 2013. Predicting thresholds of drought-induced mortality in woody plant species. *Tree physiology* 33, 669-671.

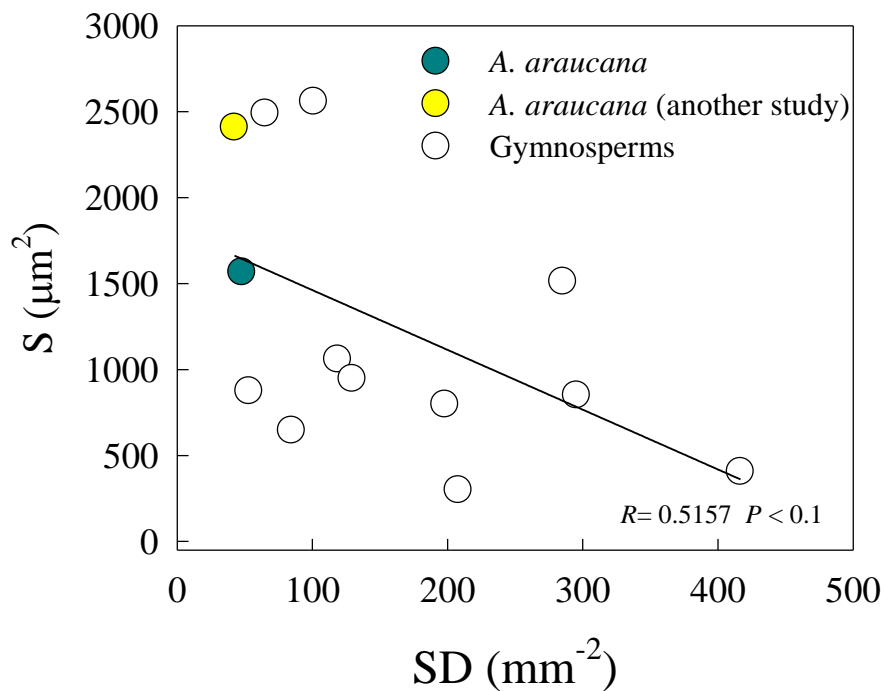
- CONAF.** 2018. [www.conaf.cl/wp-content/uploads/2015/12/Da%C3%B1o-Foliar-Araucaria-P.-Parra.pdf](http://www.conaf.cl/wp-content/uploads/2015/12/Da%C3%B1o-Foliar-Araucaria-P.-Parra.pdf) Acceso Septiembre 2019.
- Diario oficial.** 2018. [www.diariooficial.interior.gob.cl/publicaciones/2018/12/19/42233/01/1513840.pdf](http://www.diariooficial.interior.gob.cl/publicaciones/2018/12/19/42233/01/1513840.pdf) Acceso Septiembre 2019.
- Díaz-Vaz JE.** 1984. *Araucaria araucana*. Descripción anatómica. *Bosque* 5, 117-118.
- Easterling DR, Meehl GA, Parmesan C, et al.** 2000. Climate extremes: observations, modeling, and impacts. *Science* 289, 2068-2074.
- Franks PJ, Beerling DJ.** 2009. Maximum leaf conductance driven by CO<sub>2</sub> effects on stomatal size and density over geologic time. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 10343-10347.
- Galmés J, Kapralov M, Andralojc P, et al.** 2014. Expanding knowledge of the Rubisco kinetics variability in plant species: environmental and evolutionary trends. *Plant, Cell & Environment* 37, 1989-2001.
- Garreaud RD, Boisier JP, Rondanelli R, et al.** 2020. The central Chile mega drought (2010–2018): a climate dynamics perspective. *International Journal of Climatology*, 40, 421-439.
- Holz M.** 2015. Mesozoic paleogeography and paleoclimates a discussion of the diverse greenhouse and hothouse conditions of an alien world. *Journal of South American Earth Sciences* 61, 91-107.
- Iñiguez C, Galmés J, Gordillo FJL.** 2019. Rubisco carboxylation kinetics and inorganic carbon utilization in polar versus cold-temperate seaweeds. *Journal of Experimental Botany* 70, 1283-1297.
- IPCC.** 2014. Pachauri R K, L A (eds). Meyer Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change IPCC. Geneva. Switzerland. 151.
- IPCC.** 2021. Summary for Policymakers. In: Masson-Delmotte V, Zhai P, Pirani A, Connors SL, Péan C, Berger S, Caud N, Chen Y, Goldfarb L, Gomis MI, Huang M, Leitzell K, Lonnoy E, Matthews JBR, Maycock TK, Waterfield T, Yelekçi O, Yu R, Zhou B, eds. Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of

the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press. In Press.

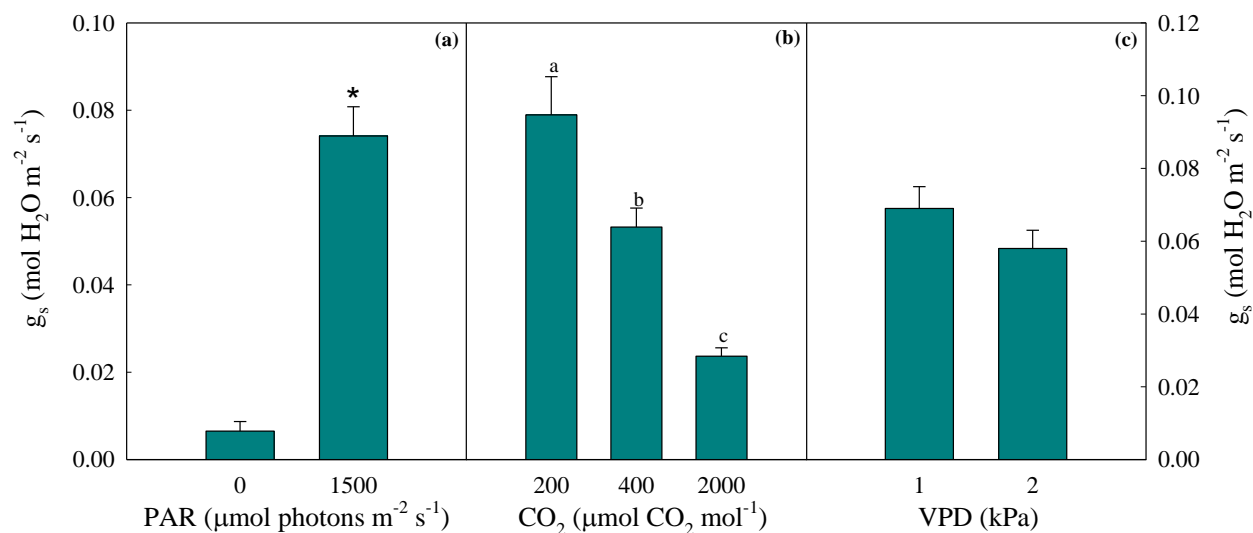
- IUCN.** 1996. World List of Threatened Trees. International Union for the Conservation of Nature. Gland, Switzerland, <http://www.iucn.org/themes/ssc/redlist/redlist.htm> URL Acceso Septiembre 2019.
- Krause AJ, Mills BJ, Zhang S, et al.** 2018. Stepwise oxygenation of the Paleozoic atmosphere. *Nature Communications* 9, 1-10.
- Kunzmann L.** 2007. Araucariaceae (Pinopsida): aspects in palaeobiogeography and palaeobiodiversity in the Mesozoic. *Zoologischer Anzeiger* 246, 257-277.
- Lusk CH.** 2001. Leaf life spans of some conifers of the temperate forests of South America. *Revista Chilena de Historia Natural* 74, 711-718.
- Martín MA, Mattioni C, Lusini I, et al.** 2014. New insights into the genetic structure of *Araucaria araucana* forests based on molecular and historic evidences. *Tree genetics & genomes* 10, 839-851.
- McDowell NG, Pockman WT, Allen CD, et al.** 2008. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist* 178,719-739.
- McDowell NG, Williams AP, Xu C, et al.** 2016. Multi-scale predictions of massive conifer mortality due to chronic temperature rise. *Nature Climate Change* 6, 295-300.
- Panti C, Pujana RR, Zamalao MC, et al.** 2012. Araucariaceae macrofossil record from South America and Antarctica. *Alcheringa: An Australasian Journal of Palaeontology* 36, 1-22.
- Pastorino MJ, Marchelli P.** 2021. Low Intensity Breeding of Native Forest Trees in Argentina: Genetic Basis for Their Domestication and Conservation. Springer.
- Pittermann J, Sperry JS, Wheeler JK, et al.** 2006. Mechanical reinforcement of tracheids compromises the hydraulic efficiency of conifer xylem. *Plant, Cell & Environment* 29, 1618-1628.
- Puchi PF, Camarero JJ, Battipaglia G, et al.** 2021. Retrospective analysis of wood anatomical traits and tree-ring isotopes suggests site-specific mechanisms triggering *Araucaria araucana* drought-induced dieback. *Global Change Biology* 27, 6394-6408.

- Ramírez C, Álvarez M, San Martín C, et al.** 2018. El cambio climático como causa de daños en bosques chilenos. *Chloris Chilensis*. [www.chlorischile.cl](http://www.chlorischile.cl) Acceso Septiembre 2019.
- Souza AF.** 2021. A review of the structure and dynamics of araucaria mixed forests in southern Brazil and northern Argentina. *New Zealand Journal of Botany* 59, 2-54.
- Stockey R.** 1982. The Araucariaceae: an evolutionary perspective. *Review of Palaeobotany and Palynology* 37, 133-154.
- Stockey R.** 1994. Mesozoic Araucariaceae: morphology and systematic relationships. *Journal of Plant Research* 107, 493-502.
- Stovall AE, Shugart H, Yang X.** 2019. Tree height explains mortality risk during an intense drought. *Nature Communications* 10, 1-6.
- Suarez ML, Ghermandi L, Kitzberger T.** 2004. Factors predisposing episodic drought-induced tree mortality in Nothofagus: site, climatic sensitivity and growth trends. *Journal of Ecology* 92, 954-966.
- Vélez ML, Salgado Salomón ME, Marfetan A, et al.** 2018. *Caracterización desecación del dosel y sanidad de Araucaria araucana en Argentina*. Technical Report. Editor Javier Sanguinetti
- Veromann-Jürgenson LL, Tosens T, Laanisto L, et al.** 2017. Extremely thick cell walls and low mesophyll conductance: welcome to the world of ancient living! *Journal of Experimental Botany* 68, 1639-1653.
- Wang XQ, Ran JH.** 2014. Evolution and biogeography of gymnosperms. *Molecular phylogenetics and evolution* 75, 24-40.
- Zimmer HC, Brodribb TJ, Delzon S, et al.** 2016. Drought avoidance and vulnerability in the Australian Araucariaceae. *Tree physiology* 36, 218-228.

## VIII. ANEXO

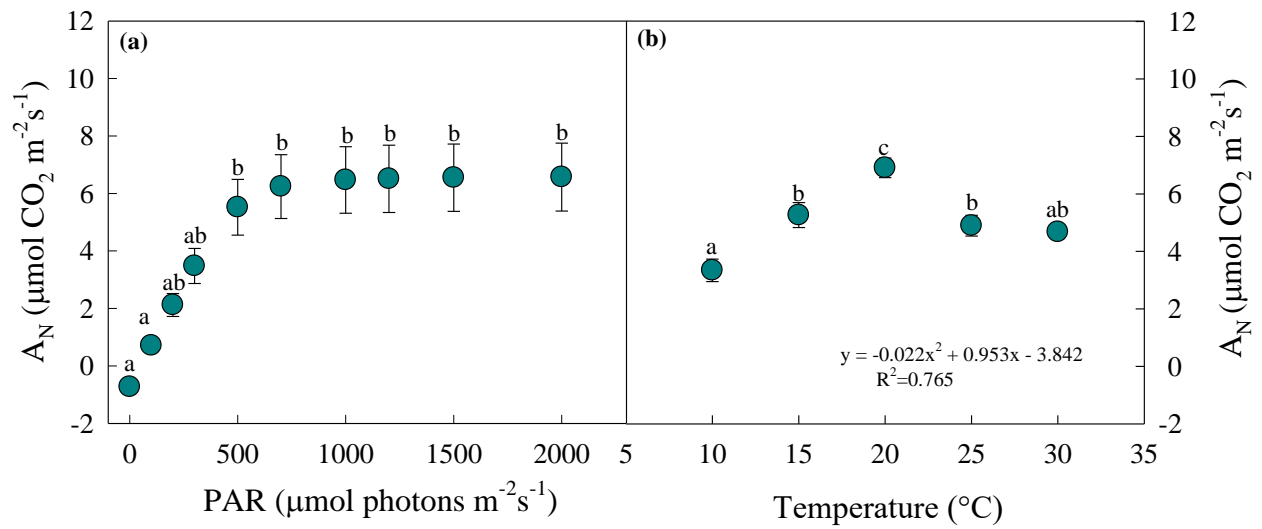


**Fig. S1** Relationship between size (S) and stomatal density (SD) of *A. araucana* from the present study, *A. araucana* from Barrera & Meza (1991) and other non-fossil gymnosperms (data obtained from Barrera & Meza, 1991 and Xiong *et al.*, 2018). The Pearson correlation coefficient and the significance of the relationship are shown.



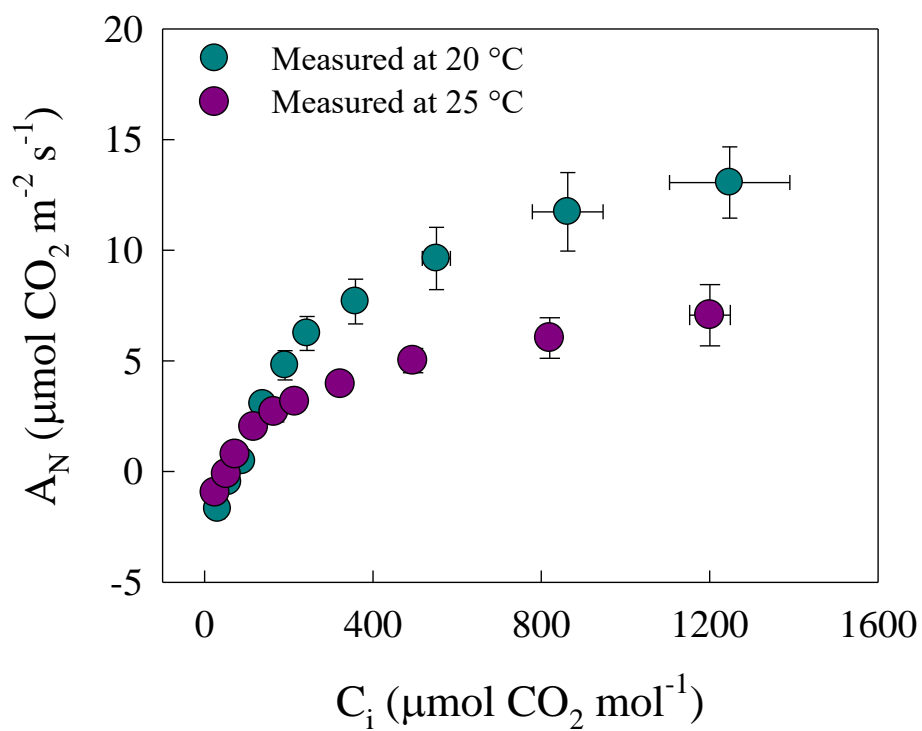
**Fig. S2** (a) The stomatal response ( $g_s$ ) of *A. araucana* to photosynthetically active radiation, PAR, (b) atmospheric  $\text{CO}_2$  concentration and (c) vapor pressure deficit, VPD. Values are means  $\pm$  S.E. ( $n = 3 - 5$ ). \* indicates significant differences according to Student's t-test ( $P < 0.05$ ). Different letters indicate significant differences among  $\text{CO}_2$  concentrations according to ANOVA and Tukey's test ( $P < 0.05$ ).



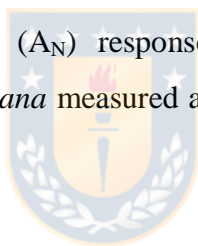


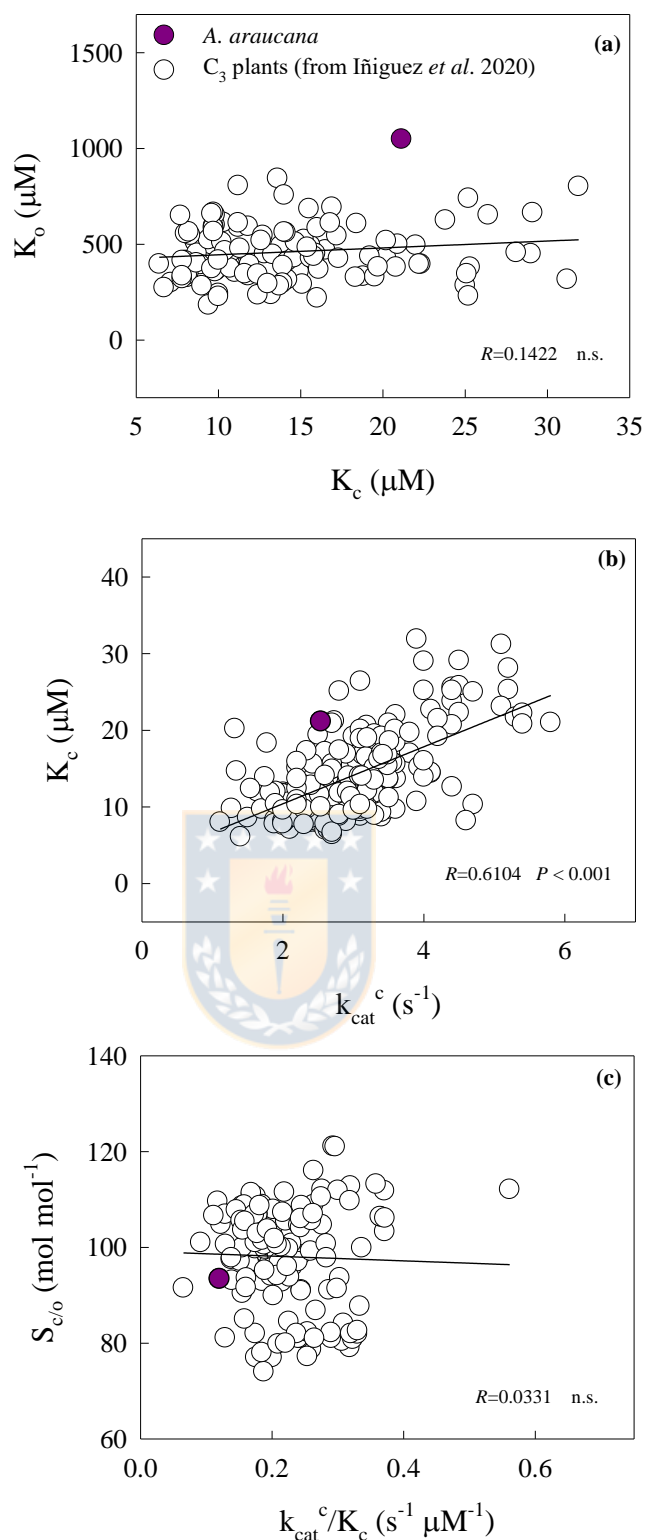
**Fig. S3** (a) The net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A_N$ ) response to photosynthetic active radiation and (b) leaf temperature in *A. araucana*. Values are means  $\pm$  S.E. ( $n = 3 - 4$ ). Different letters indicate significant differences according to ANOVA and Tukey's test ( $P < 0.05$ ). Second order polynomial equation is shown.





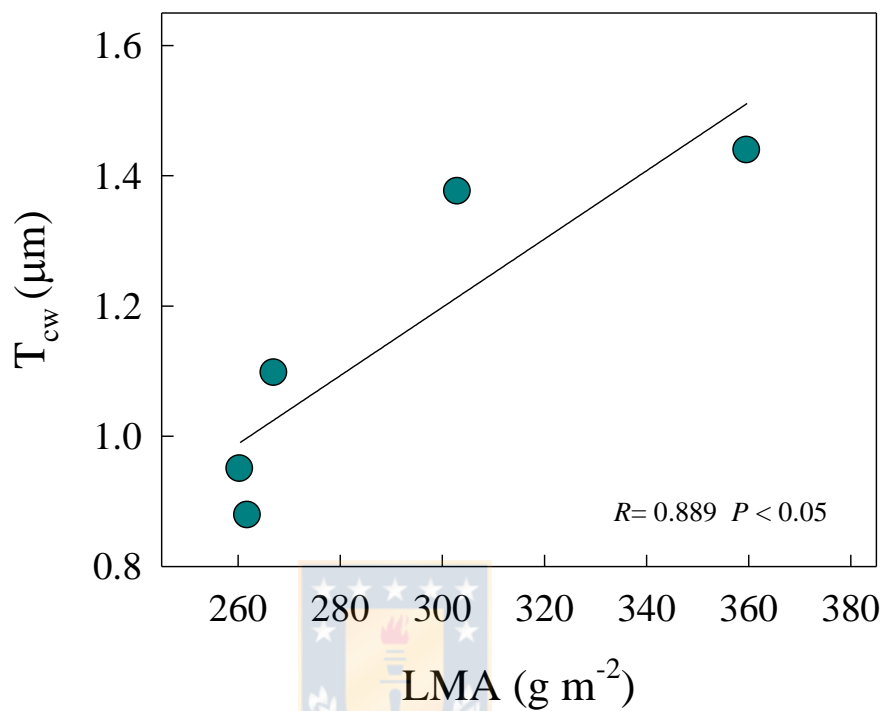
**Fig. S4** Net photosynthesis ( $A_N$ ) response curve to variant substomatal  $CO_2$  concentration ( $C_i$ ) of *A. araucana* measured at 20 °C and 25 °C. Values are means  $\pm$  S.E. ( $n = 4$ ).





**Fig. S5** Comparison of the *in vitro* Rubisco kinetic parameters of *A. araucana* in the present study with those from a recent compilation by Iñiguez *et al.* (2020) including only  $C_3$  plants. (a) The relationship between the Michaelis-Menten constant for  $O_2$  ( $K_o$ ) and for  $CO_2$  ( $K_c$ ), (b) the relationship between  $K_c$  and the maximum carboxylase catalytic turnover rate ( $k_{cat}^c$ ), and (c) the relationship between the carboxylase

catalytic efficiency ( $k_{\text{cat}}^c/K_c^{\text{air}}$ ) and the specificity factor ( $S_{c/o}$ ). All values correspond to measurements at 25 °C. The Pearson correlation coefficient and the significance of the relationship are shown.



**Fig. S6** Correlation of the cell wall thickness with the leaf mass area in *A. araucana*. The Pearson correlation coefficient and the significance of the relationship is shown.

**Table S1** Maximum, minimum, and average daytime temperature recorded during the measurement days between January and June 2019 in the nursery of the University of Concepción. Values are means  $\pm$  S.E.

Month	Maximum air temperature ( $^{\circ}$ C)	Minimum air temperature ( $^{\circ}$ C)	Mean air day temperature ( $^{\circ}$ C)
January	24.47 $\pm$ 0.37	12.94 $\pm$ 0.39	17.42 $\pm$ 0.09
April	18.34 $\pm$ 1.22	10.51 $\pm$ 0.88	13.00 $\pm$ 0.47
May	16.91 $\pm$ 1.25	7.10 $\pm$ 1.21	10.74 $\pm$ 0.89
June	20.81 $\pm$ 1.33	13.66 $\pm$ 0.84	15.83 $\pm$ 0.82

**Table S2** One-way analysis of variance (ANOVA) for photosynthesis-light curves (LC), photosynthesis-temperature curves (TC), quantitative limitations in plants measured at 20 $^{\circ}$  C (QL20) and 25 $^{\circ}$  C (QL25), and stomatal response curve to CO<sub>2</sub> (SRC), and t-test for independent samples by groups for stomatal responses curve to PAR (SRP) and VPD (SRV) in *A. araucana*. The values correspond to *P* value.

Parameters	<i>P</i> - Value
LC	< 0.0001
TC	< 0.001
QL20	n.s.
QL25	< 0.0001
SRC	< 0.0001
SRP	< 0.001
SRV	n.s.