

UCH-FC
MAB-EBE
A 283
C.1

**Efectos de las glaciaciones del Cuaternario sobre rasgos
morfológicos y fisiológicos de *Nothofagus dombeyi*
(Mirb.) Oerst (coigüe)**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva

Facultad De Ciencias

Por

MARIELA PAZ AGUILERA MIRANDA

Noviembre, 2012

Director de Tesis: **Dr. Luis Felipe Hinojosa**
Dra. María Fernanda Pérez



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

MARIELA PAZ AGUILERA MIRANDA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 16 de Octubre 2012.

Director de Tesis:

Dr. Luis Felipe Hinojosa

Co-Director de Tesis:

Dra. María Fernanda Pérez

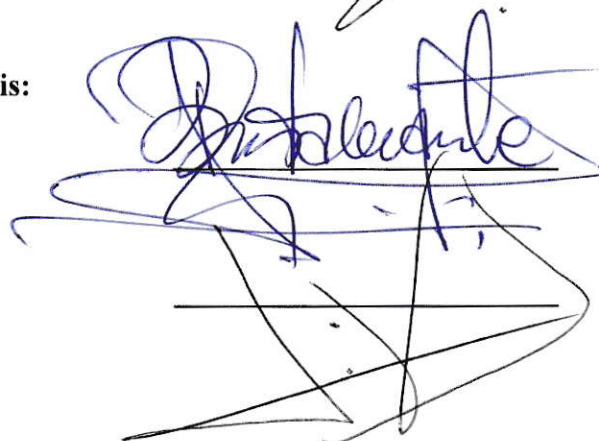
Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Ramiro Bustamante

Dr. Javier Figueroa



A handwritten signature in black ink, likely of Luis Felipe Hinojosa, is written over a circular stamp. The stamp contains the text "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL", and "U. DE CHILE" with two stars on either side of the university name.



A handwritten signature in blue ink, likely of Ramiro Bustamante, is written over a large, complex scribble in black ink that covers the lower right portion of the page.



Gracias por la vida, la inspiración y el amor.

Dedicado a las personas que amo y que me apoyaron en mi recuperación.



AGRADECIMIENTOS

Durante el desarrollo de este magister tuve la fortuna de recibir mucho apoyo, ayuda y cariño de muchas personas, especialmente en el último tiempo, en el cual mis dificultades de salud me presentaron una oportunidad única para valorar a las personas de la que me he rodeado, las decisiones que he tomado y la mujer que soy.

Quisiera partir por agradecer a mi familia, mis padres, hermanos, abuelita, tías, primos y sobrino quienes a pesar de estar de acuerdo o en desacuerdo con mis decisiones siempre tuvieron la generosidad de apoyarme, tolerarme y acogerme, especialmente en los momentos difíciles, siempre hubo un momento para estar juntos y reír.

Definitivamente la ayuda que recibí por parte de mis compañeros de laboratorio fue fundamental, Carmencha, Thais, Pauly, Pato S., Pato V., Rafa, Faby, Cony, Paz y Andrea, son un grupo humano maravilloso del cual me siento completamente parte, me escucharon, me aconsejaron y de los cuales recibí muchos buenos deseos. Bea y Xime, gracias por tiempo que ustedes decidieron invertir en nuestras conversaciones, fueron un aporte fundamental en mi aprendizaje y no solo en lo académico, si no que en la vida. Además quiero agradecer al laboratorio de Diversidad Molecular, por permitirme realizar muchos de los experimentos de mi tesis y en particular a Gioconda, Camilo, Fernanda y Camille.

Todos ustedes hicieron que sin dejar de sentirme parte de mi Universidad, me sintiera parte de la Universidad Católica y dejara atrás los prejuicios que tenía sobre la gente que estudiaba en esta.

Fundamental para la ejecución de mi tesis fue mi estadía en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad de Concepción y el profesor León Bravo. Aquí no solo aprendí técnicas para evaluar el estrés por congelamiento, sino que me sentí acogida, integrada y feliz.

Parte importante del buen desarrollo de este estudio fue gracias a la ayuda en primera instancia de mis tutores Fefa y Felipe, y luego de varios profesores: Claudio Pastenes, Karen Peña, Ángela Sierra, Martín Carmona y León Bravo, ellos colaboraron en la profundización de mis conocimientos.

No puedo dejar de agradecer a mi equipo, la Rama de Hockey Césped de la Universidad de Chile, pues han sido amigas excelentes, potenciaron lo mejor de mi, me enseñaron a amar el deporte y permitieron ser parte del equipo mas motivado y con más garra.

También a mis amigos de Universidad, que siempre fueron un aporte a nivel personal, fuente de miles de buenos momentos, de orientación y apoyo continuamente.

Piantesilla gracias por mantener el vínculo, por la contención, por ser mi mejor amiga, pues siento que el tiempo lejos geográficamente solo a fortalecido nuestra amistad.

Finalmente, agradezco el apoyo financiero al proyecto FONDECYT 1090339, Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB) y Centro de estudios avanzados en Ecología y Biodiversidad (CASEB), el cual permitió que se llevara a cabo mi tesis.

ÍNDICE

RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	9
Objetivos Generales	10
Objetivos Específicos	10
METODOLOGÍA	12
Variación de los rasgos foliares de <i>N. dombeyi</i> a lo largo de su rango de distribución	12
Obtención de muestras	12
Determinación del área foliar y de la masa por área foliar (LMA)	12
Observación de estomas	14
Obtención de epidermis foliar	14
Relación entre rasgos foliares, clima y grupos filogeográficos	14
Variación de rasgos foliares en el registro fósil	20
Variación en la tolerancia al congelamiento	20
Sitios de estudio	20
Medición de la temperatura a la que se produce el 50% del daño foliar (LT50%)	21
Extracción y cuantificación de la Prolina	21



Extracción y cuantificación del Almidón	22
Análisis estadísticos	23
RESULTADOS	24
Variación de los rasgos foliares de <i>N. dombeyi</i> a lo largo de su rango de distribución, y su relación con el clima y la filogeografía	24
Variación de los rasgos foliares en el registro fósil	33
Variación en la tolerancia al congelamiento	35
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIÓN	43
REFERENCIAS	44

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1	Ubicación geográfica, grupos filogeográficos y variables bioclimáticas de 23 poblaciones de <i>N. dombeyi</i> . Las variables bioclimáticas obtenidas de WORLDCLIM (Hijmans <i>et al.</i> , 2005) son: temperatura media anual (BIO ₁), oscilación de la temperatura media mensual (BIO ₂), isoterma (BIO ₃), estacionalidad de la temperatura (BIO ₄), temperatura máxima del mes más cálido (BIO ₅), temperatura mínima del mes más frío (BIO ₆), oscilación de la temperatura anual (BIO ₇), temperatura media del cuarto más húmedo (BIO ₈), temperatura media del cuarto más seco (BIO ₉), temperatura media del cuarto más cálido (BIO ₁₀), temperatura media del cuarto más frío (BIO ₁₁), precipitación anual (BIO ₁₂), precipitación del mes más húmedo (BIO ₁₃), precipitación del mes más seco (BIO ₁₄), estacionalidad de la precipitación (BIO ₁₅), precipitación del cuarto más húmedo (BIO ₁₆), precipitación del cuarto más seco (BIO ₁₇), precipitación del cuarto más calido (BIO ₁₈), precipitación del cuarto más frío (BIO ₁₉).	17
TABLA 2	Tabla con los resultados entregados por el ANDEVA para el área foliar, LMA y densidad estomática, al comparar las 23 poblaciones. Los Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$).	25
TABLA 3	Tabla 3. Muestra los valores promedio \pm DE del área foliar, LMA y densidad estomática de las 23 poblaciones muestreadas. Además de los grupos filogeográficos de las mismas. Las letras representan las diferencias significativas en los rasgos morfológicos a nivel interpoblacional encontrada por la prueba de Tukey.	26

TABLA 4	Se informa la contribución de las diecinueve variables bioclimáticas de las 23 poblaciones de <i>Nothofagus dombeyi</i> en los primeros dos ejes arrojados por el PCA.	28
TABLA 5	Resultados entregados por el Stepwise, de el AIC y R ² para el GLM mas simple y que mejor se ajusta a la muestra de cada rasgo morfológico. Los Asteriscos indican relaciones estadísticamente significativas (P ≤ 0,05).	30
TABLA 6	Tabla 6. Resultados entregados por el GLM, para las tres variables morfológicas con respecto a los grupos filogeográficos y los dos primeros ejes extraídos del PCA. Los Asteriscos indican relaciones estadísticamente significativas (P ≤ 0,05).	30
TABLA 7	Porcentaje de contribución de las 19 variables bioclimáticas en la presencia de <i>Nothofagus dombeyi</i> en su rango de distribución, entregado por MAXENT. Siendo las variables bioclimáticas que más contribuyen la Precipitación del cuarto más frío (BIO ₁₉) con un 39% y la Temperatura media del cuarto más húmedo (BIO ₈) en un 25,8%.	32
TABLA 8	Resultados entregados por el Stepwise, de el AIC y R ² para el GLM mas simple y que mejor se ajusta a la muestra de cada rasgo morfológico. Los Asteriscos indican relaciones estadísticamente significativas (P ≤ 0,05).	32
TABLA 9	Resultados entregados por GLM, para las tres variables morfológicas con respecto a los grupos filogeográficos, la temperatura media del cuarto más húmedo (BIO ₈) y Precipitación del cuarto más frío (BIO ₁₉).	33

TABLA 10	Resultados obtenidos de la prueba de t-Student para el área foliar y densidad estomática, al comparar hojas fósiles del afloramiento Río Caunahué con hojas actuales de la población CAU-Andes. El Asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$).	34
TABLA 11	Resultados obtenidos de la prueba de t-Student para la LT50% en plántulas y juveniles, al comparar la población de Aysén proveniente del refugio ubicado al interior de la lengua glacial y la población de Valdivia originaria del refugio situado al norte de los hielos. Los Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$).	35
TABLA 12	Resultados de la prueba de t-Student para las concentraciones de prolina y almidón, en plántulas y juveniles, al comparar la población de Aysén proveniente del refugio ubicado al interior de la lengua glacial y la población de Valdivia originaria del refugio situado al norte de los hielos. Los Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$).	36

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1** Ubicación de los hielos para el Último Máximo Glacial (UMG) en el Conosur de Sudamérica. La línea entera representa el margen del avance del hielo durante el UMG y sombreado representa la presencia de hielo en la actualidad. Mapa extraído de Hollin & Schilling, 1981. 3
- FIGURA 2** Distribución geográfica de los haplotipos. Cada número representa una localidad. Los puntos rojos representan las localidades andinas como: VIL-Andes (1), TER-Andes (2), CON-Andes (3), PUE-Andes (4), MOQ-Andes (5), CAU-Andes (6), PUY-Andes (7), VPR-Andes (8), SMA-Andes (9), MOC-Andes (10), los puntos verdes representan las localidades costeras como: NAH-Costa (11), NA-W-Costa (12), NA-E-Costa (13), PEL-W-Costa (14) y PEL-E-Costa (15). Por último, los puntos azules representan las localidades del sur como: PIC-Sur (16), CHA-Sur (17), BAL-Sur (18), QUE-Sur (19), SIM-Sur (20) y EXP-Sur (21). Los gráficos circulares muestran las frecuencias de los haplotipos. 8
- Además, se muestra el área geográfica que contiene a las poblaciones pertenecientes a cada uno de los tres grupos filogeográficos: FG 1, FG 2 y FG3.
- FIGURA 3** Mapa con la ubicación de las poblaciones de *Nothofagus dombeyi* utilizadas para analizar la variación espacial, tolerancia al congelamiento y variación temporal. Estas poblaciones son: VIL-Andes (1), TER-Andes (2), CON-Andes (3), PUE-Andes (4), MOQ-Andes (5), CAU-Andes y afloramiento fósil Río Caunahue (6), PUY-Andes (7), VPR-Andes (8), SMA-Andes (9), MOC-Andes (10), NAH-Costa (11), NA-W-Costa (12), NA-E-Costa (13), PEL-W-Costa (14), PEL-E-Costa (15), VAL-Costa (16), PIC-Sur (17), CHA-Sur 13

(18), BAL-Sur (19), QUE-Sur (20), SIM-Sur (21), EXP-Sur (22) y AYS-Sur (23).

- FIGURA 4** Representación gráfica del PCA, donde las variables bioclimáticas analizadas son: temperatura media anual (BIO₁), oscilación de la temperatura media mensual (BIO₂), isoterma (BIO₃), estacionalidad de la temperatura (BIO₄), temperatura máxima del mes más cálido (BIO₅), temperatura mínima del mes más frío (BIO₆), oscilación de la temperatura anual (BIO₇), temperatura media del cuarto más húmedo (BIO₈), temperatura media del cuarto más seco (BIO₉), temperatura media del cuarto más cálido (BIO₁₀), temperatura media del cuarto más frío (BIO₁₁), la precipitación anual (BIO₁₂), precipitación del mes más húmedo (BIO₁₃), precipitación del mes más seco (BIO₁₄), estacionalidad de la precipitación (BIO₁₅), la precipitación del cuarto más húmedo (BIO₁₆), la precipitación del cuarto más seco (BIO₁₇), precipitación del cuarto más cálido (BIO₁₈), precipitación del cuarto más frío (BIO₁₉). El eje 1 explica el 43,6% de la varianza y el eje 2 el 39,6%. 29
- FIGURA 5** Fotografías de cutículas foliares provenientes (aumento 10 x): del afloramiento fósil Río Caunahue (A) y de la población actual CAU-Andes (B). 34
- FIGURA 6** Representación gráfica del promedio ± EE del área foliar (A) y de la densidad estomática (B) correspondiente a el afloramiento fósil Río Caunahue y la población actual CAU-Andes. El Asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$). 34
- FIGURA 7** Representación gráfica del promedio ± EE de la temperatura a la que se produce el 50% del daño foliar (LT50%), en plántulas y juveniles de las poblaciones de Aysén (proveniente 36

del refugio ubicado al interior de la lengua glacial) y Valdivia (originaria del refugio situado al norte de los hielos). Los Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$).

FIGURA 8 Representación gráfica de la concentración promedio \pm EE de prolina en plántulas y juveniles (**A**), y de almidón en plántulas y juveniles (**B**), de las poblaciones de Aysén (proveniente del refugio ubicado al interior de la lengua glacial) y Valdivia (originaria del refugio situado al norte de los hielos). Los Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$). 37

RESUMEN

Los ciclos glaciares–interglaciares del Pleistoceno afectaron fuertemente la distribución de los bosques templados del Sur de Sudamérica. Durante las fases glaciares, algunas especies contrajeron su rango de distribución al Norte de línea de hielo, mientras que otras fueron capaces de sobrevivir en refugios locales dentro en las zonas afectadas. El objetivo de este estudio fue dilucidar si el hecho que *Nothofagus dombeyi* hubiera sobrevivido durante el Ultimo Máximo Glacial (UMG) en múltiples refugios, pudo resultar en una diferenciación de los rasgos fisiológicos y morfológicos que le permiten tolerar el frío. Específicamente se evaluó, (1) la relación entre la variación de los rasgos foliares actuales con respecto al clima y a grupos filogeográficos; (2) la variación de los rasgos foliares entre hojas fósiles de *N. dombeyi* de edades de entre 15000 y 5000 años antes del presente; y (3) la variación de la tolerancia al congelamiento entre poblaciones actuales filogeográficamente distintas.

En este estudio se muestrearon 23 poblaciones de *Nothofagus dombeyi* desde los 35° S a los 46°S. Se determinaron los siguientes parámetros foliares: densidad estomática, área foliar y masa por el área foliar (LMA). Las hojas fósiles fueron obtenidas de la localidad Río Caunahué (XIV Región, Chile), cuya edad abarca entre 15.000 y 5000 años antes del presente.

Los resultados muestran que los tres rasgos morfológicos variaron significativamente entre las poblaciones del grupo filogeográfico 2, la densidad estomática fue el único rasgo foliar que pareciese mostrar un efecto histórico probablemente debido a las

glaciaciones del Cuaternario, lo cual se ve reforzado por el comportamiento conservado de este rasgo en el coigüe por los últimos 15.000 años. Con respecto al área foliar y al LMA, ambos rasgos parecen mostrar una ausencia de efectos históricos debido a las glaciaciones del Cuaternario, lo que podría explicarse en el primer caso probablemente debido a que el área foliar pareciera variar rápidamente a lo largo de los últimos 15.000 años que no conserva el efecto histórico y el LMA probablemente debido a que no está respondiendo tan ajustadamente a las variaciones del clima, como se sugiere en la literatura, lo que no le ofrecería al coigüe una estrategia ventajosa para tolerar el medio ambiente cambiante.

La temperatura a la cual ocurre el 50% del daño foliar (LT50%), en plántulas y juveniles de dos poblaciones diferenciadas genéticamente (Valdivia y Aysén) evidencian que, en ambos casos, la población expuesta a menores temperaturas invernales fue la que más toleró el congelamiento (Aysén). Se evaluaron posibles mecanismos envueltos en la tolerancia al congelamiento (acumulación de prolina y almidón), donde presentaron menores cantidades de prolina en plántulas Valdivianas y juveniles de Aysén; en cambio el almidón fue significativamente mayor en los juveniles de Aysén. La inconsistencia presentada entre las poblaciones más tolerantes al congelamiento y las mayores concentraciones de prolina y menores de almidón, puede deberse a situaciones adicionales de otros tipos de estrés vegetal.

ABSTRACT

Glacial-interglacial cycles of the Pleistocene strongly affected the distribution of temperate forests of South America. During glacial stages, the distribution range of some species north of the ice line contracted while others were able to survive in local shelters inside the affected areas. The aim of this study was to elucidate whether the fact that *Nothofagus dombeyi* had survived during the Last Glacial Maximum (LGM) in multiple shelters, could result in a differentiation of physiological and morphological features that enable it to tolerate the cold. This question was addressed through three main approaches: (1) we evaluated the connection between the variation of leaf traits in regard to climate and phylogeographic groups, (2) the variation of leaf traits in the fossil record and (3) the variation of freezing tolerance.

During the first approach we sampled 23 populations of *Nothofagus dombeyi* from 35°S to 46°S latitude. Stomatal density, leaf area and leaf mass per area (LMA) was determined. The second approach was addressed by comparing the leaf area and stomatal density of fossil leaves of two different strata of the fossil outcrop Rio Caunahue (corresponding to 15,000 and 5,000 years BP). Climatic fluctuations occurred during these 10,000 years of fossil record: the end of this period was estimated increased 2.0°C mean annual temperature and a decrease of 20 mm mean annual precipitation in the area

The three morphological traits varied significantly between populations of phylogeographic group 2, the variation stomatal density would be probably an effect of fragmentation and isolation caused by the glaciations. This is reinforced by the conserved behavior of this trait in coigüe for the past 15,000 years.

With respect to leaf area and LMA, both features appear to show a lack of historical effects due to the Quaternary glaciation, which could be explained in the first case probably because leaf area seemed vary so rapidly over the past 15.000años that does not preserve the historical effect and LMA probably because it is not responding so tightly with the weather as suggested in the literature, which does not offer the coigüe an advantageous strategy to tolerate the changing environment.

To carry out the third approach the temperature at which 50% of leaf damage occurs was measured (LT_{50}) in seedlings and juveniles in two genetically distinct populations (Valdivia and Aysen). The genetic difference of these populations is due to the effect of isolation caused by glaciation. In both cases, the population exposed to lower winter temperatures resulted in the highest freezing tolerarance, responding tightly to climate. In addition, we evaluated the mechanisms involved in freezing tolerance (accumulation of proline and starch). Valdivian seedlings and Aysen juvenile plants presented lower amounts of proline, whereas the starch was significantly higher in juveniles from Aysen. The inconsistency between the populations more tolerant to freezing and the highest concentrations of presented proline and starch monomers may have been caused by additional situations due to other forms of plant stress.

INTRODUCCIÓN

Los ciclos glaciares–interglaciares del Pleistoceno afectaron fuertemente la distribución de los bosques templados del Sur de Sudamérica (Villagrán, 1991, Villagrán & Hinojosa 2005). Durante las fases glaciares, algunas especies contrajeron su rango de distribución al Norte de línea de hielo, mientras que otras fueron capaces de sobrevivir en refugios locales dentro de las zonas afectadas (Figura 1) (Marchelli *et al.*, 1998; Premoli *et al.*, 2002). Se consideran refugios glaciares aquellas posibles áreas libres de hielo durante el período Cuaternario, que les ofrecía a la biota hábitats favorables y donde especies del sur de Sudamérica persistieron a los efectos de las glaciaciones, en especial a aquellas del Último Máximo Glacial (UMG, Premoli *et al.*, 2000), período que se extiende entre los 29000¹⁴C y 14000¹⁴C años antes del presente (Denton *et al.*, 1999), durante el cual se estima un descenso de las temperaturas medias de entre 6°C a 8°C (Heusser *et al.*, 1999).

Esta historia de contracción y expansión de poblaciones provenientes de diferentes áreas de refugios durante los ciclos glacial/interglacial del Cuaternario, tuvieron efectos sobre la diferenciación genética de muchas especies (Hewitt, 1996; Hewitt, 2004). Estudios filogeográficos con marcadores cloroplastidiales (ADNcp) e isoenzimas proveen evidencia genética que sugiere que poblaciones de especies arbóreas del sur de Sudamérica habrían sobrevivido a los hielos glaciares del Cuaternario en múltiples y

pequeños refugios, a partir de los cuales se habrían expandido tras el retroceso de la lengua glacial (Marchelli *et al.*, 1998; Premoli *et al.*, 2000; Bekessy *et al.*, 2002; Premoli *et al.*, 2002; Mathiansen & Premoli, 2010). Ejemplos de especies cuyas poblaciones sufrieron este fenómeno son: *Pilgerodendron uviferum*, la cual habríapermanecido en múltiples refugios durante el UMG, algunos ubicados en límite Norte de su distribución (39°35`S) y otros en pequeñas áreas libres de hielo en Patagonia, específicamente en el área de Puerto Aysén (45°S, Premoli *et al.*, 2002); otro ejemplo proviene de la reconstrucción filogeográfica de *Nothofagus alpina*, donde las diferencias en marcadores cpDNA de las poblaciones al sur de los 39°38`S con las del norte sugieren, que al retirarse los glaciares, sus poblaciones se habrían expandido a partir de un refugio ubicado en la costa Oeste del Pacífico y desde pequeños refugios ubicados en la Cordillera de los Andes (Marchelli *et al.*, 1998).

Si bien, el estudio filogeográfico de las consecuencias de los ciclos glaciares sobre la distribución actual de especies forestales y su diferenciación genética, han sido documentadas para una variedad de taxa (Premoli, 1998; Marchelli *et al.*, 1998; Premoli *et al.*, 2000; Premoli *et al.*, 2002; Premoli *et al.*, 2003; Bekessy *et al.*, 2002), las consecuencias de esta historia de contracción/expansión durante los ciclos glaciares sobre rasgos fenotípicos y fisiológicos son menos conocidos (Premoli & Brewer, 2007).

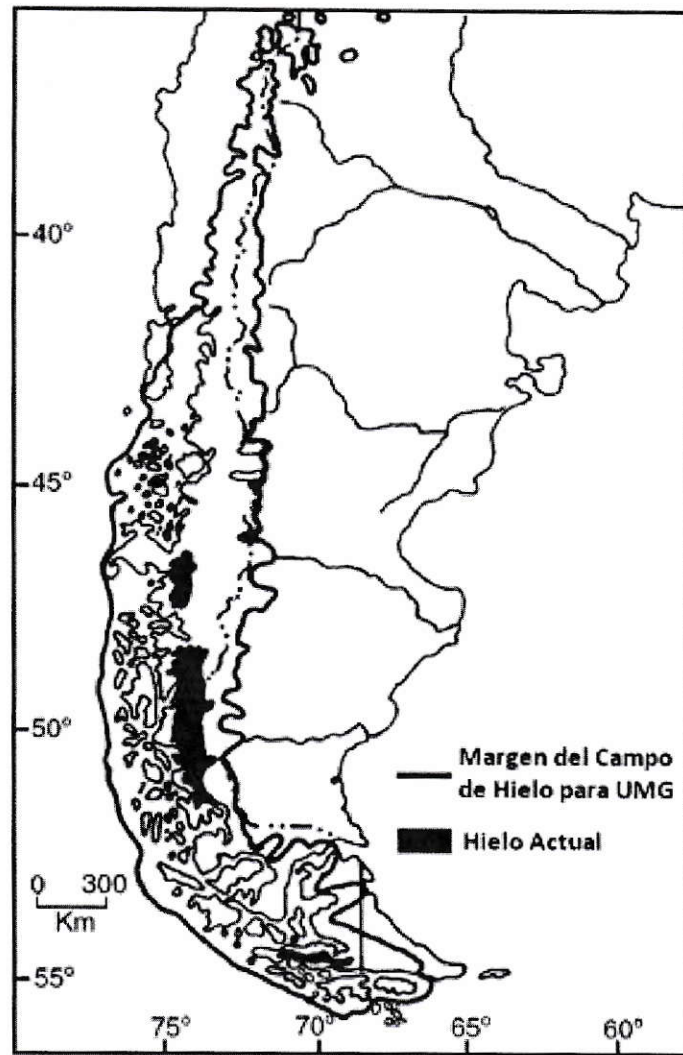


Figura 1. Ubicación de los hielos para el Último Máximo Glacial (UMG) en el Conosur de Sudamérica. La línea entera representa el margen del avance del hielo durante el UMG y sombreado representa la presencia de hielo en la actualidad. Mapa extraído de Hollin & Schilling, 1981.

Las plantas pueden responder a cambios ambientales por medio del ajuste de sus rasgos funcionales, esta modificación de sus variables fisiológicas o morfológicas de acuerdo al clima en que habitan, lo que podría ofrecerle a las especies vegetales un mayor grado de adaptabilidad frente a un medio cambiante, permitiendo, por ejemplo, un mejor aprovechamiento de los recursos disponibles (Violle *et al.*, 2007).

Rasgos funcionales que presentan variación asociada a la aridez y, o a la temperatura son, por ejemplo: el área foliar, la masa por el área foliar (LMA) y la densidad estomática (Limin *et al.*, 2007; Figueroa *et al.*, 2010; Fajardo & Piper 2011; Dinnis *et al.*, 2011; Giordano *et al.*, 2011). Así, para climas secos y fríos las especies vegetales presentan menores áreas foliares (Cordell *et al.*, 1998; Cordell *et al.*, 2000; Carlson *et al.*, 2010), mayores LMA (Vitousek & Matson, 1990; Carlson *et al.*, 2010; Cordell *et al.*, 1998), lo que se asocia con la disminución en la pérdida de agua (Poblete *et al.*, 1991; Carlson *et al.*, 2010). La sequía es un fenómeno que ocurre en los climas fríos, debido a que el agua no se encuentra disponible para las especies vegetales por estar en estado de hielo o de nieve y al haber fuertes vientos aumentará la evapotranspiración, resultando en un incremento en la pérdida de agua por parte de la planta. Se ha sugerido que la variación del área foliar y el LMA con respecto al clima, podría tener valor adaptativo frente a la sequía (Ramírez-Valiente *et al.*, 2009^a; Ramírez-Valiente *et al.*, 2010). Debido a que la disminución del área foliar, resulta en una reducción de la superficie externa de la hoja con respecto al volumen de la misma, la pérdida de agua será menor (Poblete *et al.*, 1991) y al aumentar el LMA, la hoja será más gruesa oponiendo más resistencia a la pérdida de agua (Carlson *et al.*, 2010). En ambos casos la consecuencia es la disminución de la evapotranspiración de la planta y

por ende una mejor conservación del recurso hídrico en condiciones de sequía y/o frío, evitando la deshidratación (Poblete *et al.*, 1991; Carlson *et al.*, 2010)

Con respecto a la densidad estomática se ha descrito que es mayor en individuos de la misma especie que habitan en climas fríos (Hovenden & Brodibb, 2000; Premoli & Brewer, 2007). La menor densidad estomática, puede ser beneficiosa en climas secos y cálidos, debido a que en ocasiones puede resultar en una menor conductancia estomática (Figueroa *et al.*, 2010), disminuyendo la pérdida de agua e incluso aumentando el uso eficiente del agua (Limin *et al.*, 2007). Además, vale la pena destacar que para éste rasgo en particular, se han documentado variaciones temporales asociadas a cambios en las concentraciones ambientales de CO₂ (Woodward, 1987; Woodward & Bazzaz, 1988; Peñuelas & Matamala 1990; Woodward & Kelly, 1995; Beerling & Kelly, 1997).

Nothofagus dombeyi (Mirb.) Oerst (coigüe) es una especie endémica de los bosques templados del Sur de Chile y Argentina. En Chile crece entre los 33°S y los 47°S en la Cordillera de los Andes, Cordillera de la Costa, y Depresión Intermedia (Donoso, 2006). Crece en hábitats formados por escoria volcánica sometidos a una intensa radiación durante el día y frías temperaturas durante la noche (Alberdi, 1987), presenta una alta tolerancia a la desecación, al frío y al congelamiento (Alberdi *et al.*, 1974). También, muestra resistencia estacional al congelamiento, es decir alcanza su máxima tolerancia en otoño e invierno y su mínima en primavera-verano, tanto en adultos como plántulas (Meza-Basso *et al.*, 1986; Alberdi *et al.*, 1988; Reyes-Díaz *et al.*, 2005). El aumento de la tolerancia estacional al congelamiento va acompañado del incremento de prolina (Meza-Basso *et al.*, 1986), el cual junto con el aumento de otros solutos compatibles, es un efectivo mecanismo protector del frío, debido a que permite evitar o

disminuir el déficit hídrico celular generado por el congelamiento (Buchanan, 2001; Azcón-Bieton, 2008).

Al comparar individuos de *Nothofagus dombeyi* creciendo a diferentes altitudes en el Sur de Chile, se encuentra el mismo patrón estacional de tolerancia al congelamiento mencionado anteriormente, pero además en las zonas de mayor altitud se observan individuos más tolerantes al congelamiento que en zonas de menor altitud y por ende más cálidas (Alberdi *et al.*, 1988). Los individuos localizados en tierras más altas, presentan un mayor contenido de ácidos grasos insaturados en la membrana de los cloroplastos como respuesta al frío (Alberdi *et al.*, 1990; Zúñiga *et al.*, 1990; Alberdi *et al.*, 1991). No es claro, sin embargo, si estas diferencias tienen base genética (adaptación local) o son el resultado de plasticidad fenotípica, fenómeno que corresponde a la producción de varios fenotipos en respuesta a diferentes condiciones ambientales a partir de un genotipo (Lincoln *et al.*, 2009).

Acosta y Premoli en el 2010, utilizando cpADN documentaron para *N. dombeyi*, y para otras especies del género, un fuerte quiebre filogeográfico a los 43°S. Este quiebre ha sido documentado para otras especies arbóreas de los bosques templados, y ha sido atribuido al aislamiento producidos por glaciaciones (Sérsic *et al.*, 2011), y también por eventos anteriores ocurridos en el terciario (Mathiasen & Premoli, 2010). Pérez & Hinojosa (datos no publicados) utilizando la región rpl32-trnL del cpADN, también documentaron un fuerte quiebre a los 42°S para *N. dombeyi*, además de un segundo quiebre a los 36°S (Figura 2). También detectaron poblaciones con alta diversidad genética en la Cordillera de la Costa, precordillera de los Andes, y la región de Aysén, lo que sugiere que las poblaciones de coigüe fueron capaces de sobrevivir el

últimomáximo glacial (UMG) en múltiples refugios. Estos refugios habrían estado expuestos a condiciones climáticas extremadamente disímiles, pues mientras los refugios ubicados en la Cordillera de la Costa estaban fuera de la lengua glacial e influenciados por el océano, que suaviza las condiciones ambientales, los refugios más australes y los andinos se encontraban rodeados de hielo glaciar.

La hipótesis que poblaciones de coigüe lograron permanecer el UMG tras la línea de los hielos también es apoyada por evidencia fósil. Hojas fósiles de coigüe han sido registradas a los 15.000 años de antigüedad en el afloramiento del Río Caunahué (40°22' S, 72°20' W) ubicado en la precordillera de los Andes. Este afloramiento corresponde a una secuencia sedimentaria lacustre que posee estratos ordenados datados entre 5.000 y 15.000 años. Hojas fósiles de coigüe han sido detectadas a lo largo de toda la secuencia, indicando que poblaciones de coigüe lograron sobrevivir a las fuertes fluctuaciones climáticas que ocurrieron en este período. La presencia de esta especie, durante la época de depositación del Río Caunahué, en las cercanías a este afloramiento fósil es confirmado por datos polínicos (Markgraf, 1991)

Con estos antecedentes es relevante preguntarse si la larga historia de aislamiento de las poblaciones de *Nothofagus dombeyi* en distintos refugios durante el UMG y las disímiles condiciones climáticas a las que se vieron expuestas durante este período tuvieron efectos adaptativos sobre los rasgos morfológicos y ecofisiológicos relacionados con el frío.

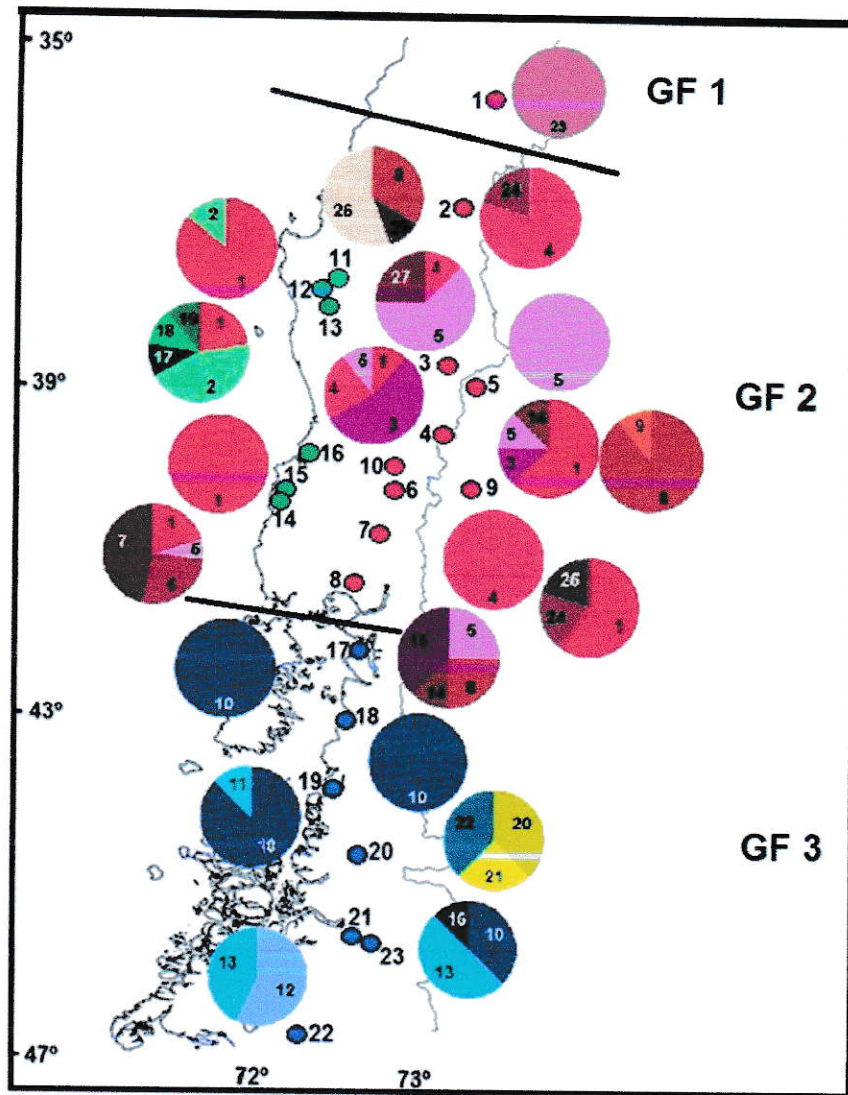


Figura 2. Distribución geográfica de los haplotipos de *Nothofagus dombeyi*. Cada número representa una localidad. Los puntos rojos representan las localidades andinas como: VIL-Andes (1), TER-Andes (2), CON-Andes (3), PUE-Andes (4), MOQ-Andes (5), CAU-Andes (6), PUY-Andes (7), VPR-Andes (8), SMA-Andes (9), MOC-Andes (10), los puntos verdes representan las localidades costeras como: NAH-Costa (11), NA-W-Costa (12), NA-E-Costa (13), PEL-W-Costa (14) y PEL-E-Costa (15). Por último, los puntos azules representan las localidades del sur como: PIC-Sur (16), CHA-Sur (17), BAL-Sur (18), QUE-Sur (19), SIM-Sur (20) y EXP-Sur (21). Los gráficos circulares muestran las frecuencias de los haplotipos. Además, se muestra el área geográfica que contiene a las poblaciones pertenecientes a cada uno de los tres grupos filogeográficos: FG 1, FG 2 y FG3 (datos de Pérez & Hinojosa no publicados).

Hipótesis y predicciones de trabajo:

Dado que las poblaciones de *Nothofagus dombeyi* permanecieron aisladas prolongadamente en diferentes áreas de refugio; y las disímiles condiciones climáticas que pudieron haber tolerado durante el UMG, se espera encontrar una acumulación de diferencias fenotípicas relacionadas con la tolerancia al clima.

Para dar respuesta a esta hipótesis exploraremos tres fuentes de variación:

1. Variación de los rasgos foliares de *N. dombeyi* a lo largo de su rango de distribución

Dado que a lo largo de la historia de *N. dombeyi* en los bosques del sur de Chile se ha promovido una diferenciación genética de esta especie, resultando en tres grupos filogeográficos distintos (Pérez & Hinojosa datos no publicados), se espera que variables morfológicas (área foliar, LMA y densidad estomática) difieran entre grupos filogeográficos y con el clima al que está expuesta esta especie.

2. Variación de rasgos foliares en el registro fósil

En la localidad Río Caunahué se ha descrito una variación climática entre los 15.000 años y 5.000, siendo menores las temperaturas en 2.0°C y mayores en 20mm las precipitaciones a las que se expusieron los fósiles pertenecientes al estrato de 15.000 años del afloramiento Río Caunahué (L.F. Hinojosa datos no publicados), entonces se espera que las hojas fósiles pertenecientes al estrato datado con 5.000 años de

antigüedad de este depósito lacustre sean de mayor tamaño y tengan menor densidad estomática que los fósiles pertenecientes al estrato de 15.000 años atrás.

3. Variación en la tolerancia al congelamiento

Dado que las poblaciones de *N. dombeyi* de Aysén y cordillera de la costa al norte de los 42°S provienen de dos refugios glaciares que permanecieron aislados y soportaron condiciones climáticas contrastantes durante el Cuaternario, entonces se espera que la población que proviene del refugio ubicado más al norte en una zona costera sea menos tolerante al frío que la población que proviene del refugio al sur de Aysén.

Así, el objetivo general de esta tesis fue evaluar si el largo aislamiento y las condiciones climáticas contrastantes a las que se vieron expuestas diferentes poblaciones de *N. dombeyi* durante el UMG, resultaron en una diferenciación de rasgos morfológicos y ecofisiológicos de la especie.

Objetivos específicos

1. Examinar la variación espacial del área foliar, LMA y densidad estomática en el rango de distribución de *N. dombeyi* y su relación con los grupos filogeográficos y con el clima.
2. Examinar la variación temporal del área foliar y densidad estomática en *N. dombeyi* en el afloramiento fósil Río Caunahué en 10.000 años de registro fósil.

3. Comparar las diferencias en la tolerancia al congelamiento (LT50%) y el posible mecanismo crioprotector involucrado (ajuste osmótico) entre poblaciones de *N. dombeyi* provenientes de distintos refugios glaciares del Cuaternario.

METODOLOGÍA

1. Variación de los rasgos foliares de *N. dombeyi* a lo largo de su rango de distribución.

1.1 Obtención de muestras

Se colectaron muestras foliares de individuos juveniles de *N. dombeyi* (con aproximadamente dos metros de altura) de 23 sitios (Figura 3, Tabla 1) a lo largo de un gradiente latitudinal en el Centro-Sur de Chile (35° a 46° S) en el Verano del 2009. Para cada individuo (10 individuos por sitio) se colectó una rama expuesta al sol con hojas maduras, sanas y de tallo lignificado de 10 individuos. El material de cada individuo fue transportado y almacenado en bolsas con Silica Gel.

1.2 Determinación del área foliar y de la masa por área foliar (LMA)

Fueron escaneadas 10 hojas por individuo y 10 individuos por población, para las 23 localidades (Figura 3). Luego, se les midió el área foliar mediante el programa Sigma Scan Pro. Posteriormente, las hojas fueron secadas a 60°C por 12 horas para determinar su peso seco y estimar la razón masa por área foliar (LMA). Se utilizó el método modificado de Vitousek y colaboradores (1990).

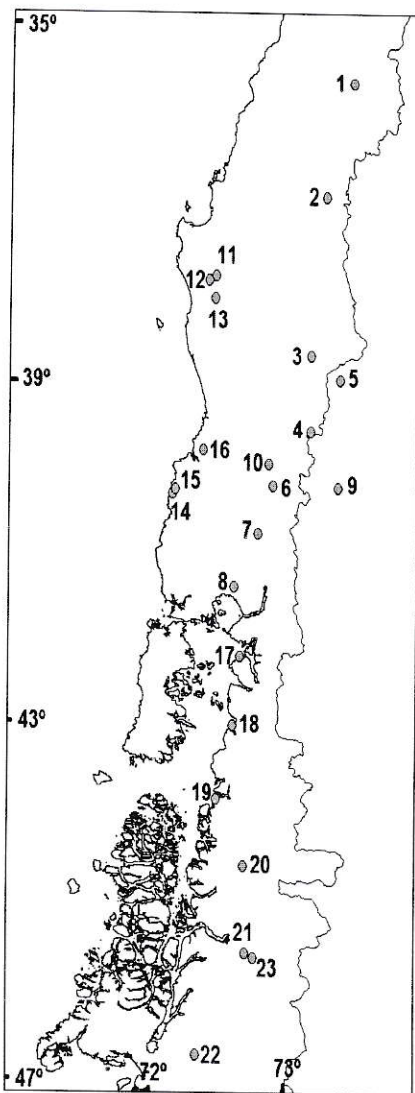


Figura 3. Mapa con la ubicación de las poblaciones de *Nothofagus dombeyi* utilizadas para analizar la variación espacial, tolerancia al congelamiento y variación temporal. Estas poblaciones son: VIL-Andes (1), TER-Andes (2), CON-Andes (3), PUE-Andes (4), MOQ-Andes (5), CAU-Andes y afloramiento fósil Río Caunahue (6), PUY-Andes (7), VPR-Andes (8), SMA-Andes (9), MOC-Andes (10), NAH-Costa (11), NA-W-Costa (12), NA-E-Costa (13), PEL-W-Costa (14), PEL-E-Costa (15), VAL-Costa (16), PIC-Sur (17), CHA-Sur (18), BAL-Sur (19), QUE-Sur (20), SIM-Sur (21), EXP-Sur (22) y AYS-Sur (23).

1.3 Obtención de epidermis foliar

Hojas de *N. dombeyi* con el borde cortado se colocaron en Hipoclorito de Sodio al 4,9 % entre 2 a 4 días dependiendo del tamaño y calidad de la hoja, luego con la ayuda de pinzas y pinceles se separaron y limpiaron ambas cutículas, visualizándolas en una lupa. La cutícula correspondiente a la cara abaxial se colocó sobre un porta objetos, se montó con gelatina-glicerina y se tiñó con azul de metileno por 30 segundos, finalmente la muestra se lavó con agua destilada y se colocó el cubre objetos. Se utilizó el método modificado de Johansen (1940).

1.4 Observación de estomas

La cutícula inferior fue observada en un microscopio Olimpicus cx31, y se cuantificaron los estomas en un área de $1,0 \text{ mm}^2$ en dos sectores ubicados a cada lado de la vena media en el centro de la hoja. Estas mediciones se realizaron en 3 hojas por cada uno de los 5 individuos en las 23 diferentes localidades (Figura 3).

1.5 Relación entre rasgos foliares, clima y grupos filogeográficos

Se determinó si las 23 poblaciones muestreadas presentaban variación en alguno de los tres rasgos foliares entre los grupos filogeográficos y dentro de los mismos. Para esto se realizó un Análisis de varianza anidado (ANDEVA anidado) para cada rasgo foliar incluyendo los grupos filogeográficos y las poblaciones anidadas en los grupos filogeográficos (Grupos filogeográficos; Grupo filogeográficos (Poblaciones)). Una

comparación a posteriori se realizó mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Se evaluó si la variación espacial mostrada por los rasgos morfológicos a lo largo de 23 poblaciones se asociaba a diferencias climáticas, al hecho de que las poblaciones pertenezcan a diferentes grupos filogeográficos o a la interacción de ambos. Para ello se ordenaron las 23 poblaciones de *Nothofagus dombeyi* muestreadas en función de 19 variables bioclimáticas a través de un análisis de componente principales (PCA). Las variables bioclimáticas fueron obtenidas a partir de la base de datos WorldClim (Hijmans et al, 2005). Las variables bioclimáticas utilizadas son las siguientes: temperatura media anual (BIO₁), oscilación de la temperatura media mensual (BIO₂), isoterma (BIO₃), estacionalidad de la temperatura (BIO₄), temperatura máxima del mes más cálido (BIO₅), temperatura mínima del mes más frío (BIO₆), oscilación de la temperatura anual (BIO₇), temperatura media del cuarto más húmedo (BIO₈), temperatura media del cuarto más seco (BIO₉), temperatura media del cuarto más cálido (BIO₁₀), temperatura media del cuarto más frío (BIO₁₁), precipitación anual (BIO₁₂), precipitación del mes más húmedo (BIO₁₃), precipitación del mes más seco (BIO₁₄), estacionalidad de la precipitación (BIO₁₅), precipitación del cuarto más húmedo (BIO₁₆), precipitación del cuarto más seco (BIO₁₇), precipitación del cuarto más cálido (BIO₁₈), precipitación del cuarto más frío (BIO₁₉) (Tabla 1). En seguida se hizo un Stepwise para seleccionar el Modelo General Lineal (GLM) para cada variable morfológica, este Stepwise comparó modelos que consideraron los dos ejes extraídos del PCA (los cuales corresponden a combinaciones lineales de las variables ambientales), los grupos filogeográficos y las interacciones entre cada eje extraído del PCA y los grupos

filogeográficos como variables independientes (Tabla 1). El GLM que más se ajustó a la muestra se seleccionó con el Criterio de Información de Akaike (AIC) y enseguida se realizó sobre su respectiva variable morfológica. Además se realizó una Modelación de Nicho climático para *N. dombeyi* con el programa MAXENT, para discriminar las dos variables bioclimáticas más determinantes para la presencia de la especie vegetal en la zona geográfica muestreada. Para esto se ingresaron 290 puntos de presencia de la especie, seleccionándose en forma aleatoria el 25% para la evaluación del modelo. Los parámetros utilizados fueron: randomseed, 100 réplicas y validación por medio de bootstrap. El análisis se efectuó sobre la representación geográfica de 19 variables bioclimáticas con resolución de 1arosegundo, del área habitada por *N. dombeyi*.

Luego se hizo un Stepwise para seleccionar el Modelo General Lineal (GLM) para cada rasgo morfológico, el cual comparó modelos que consideraron dos variables bioclimáticas (elegidas a partir de la modelación de nicho climático), los grupos filogeográficos y las interacciones entre cada variable bioclimática y los grupos filogeográficos como variables independientes (Tabla 1). El GLM que más se ajustó a la muestra se seleccionó con el Criterio de Información de Akaike (AIC) y enseguida se realizó sobre su respectiva variable morfológica.

Los análisis estadísticos se realizaron con Statistica (séptima versión), a excepción de los GLM y los Stepwise, que se realizaron con el programa R (R Development Core Team, 2010)

Tabla 1. Ubicación geográfica, grupos filogeográficos y variables bioclimáticas de 23 poblaciones de *N. dombevi*. Las variables bioclimáticas obtenidas de WORLDCLIM (Hijmans *et al.*, 2005) son: temperatura media anual (BIO₁), oscilación de la temperatura media mensual (BIO₂), isoterma (BIO₃), estacionalidad de la temperatura (BIO₄), temperatura máxima del mes más cálido (BIO₅), temperatura mínima del mes más frío (BIO₆), oscilación de la temperatura anual (BIO₇), temperatura media del cuarto más húmedo (BIO₈), temperatura media del cuarto más seco (BIO₉), temperatura media del cuarto más cálido (BIO₁₀), temperatura media del cuarto más frío (BIO₁₁), precipitación anual (BIO₁₂), precipitación del mes más húmedo (BIO₁₃), precipitación del mes más seco (BIO₁₄), estacionalidad de la precipitación (BIO₁₅), precipitación del cuarto más húmedo (BIO₁₆), precipitación del cuarto más seco (BIO₁₇), precipitación del cuarto más cálido (BIO₁₈), precipitación del cuarto más frío (BIO₁₉).

Longitud (° W)	Grupo Filogeográfico	Código (Figura 3)	Población	Población (Nombre completo)
71,0600	1	1	VIL-Andes	Vilches
71,4500	2	2	TER-Andes	Termas de Chillán
71,6519	2	3	CON-Andes	Conguillio
71,6586	2	4	PUE-Andes	Puesco
71,2186	2	5	MOQ-Andes	Moquehue
72,2075	2	6	CAU-Andes	Río Caunahué
72,4194	2	7	PUY-Andes	Puyehue
72,7766	2	8	VPR-Andes	Vicente Pérez Rosales
71,24	2	9	SMA-Andes	San Martín
72,2705	2	10	MOC-Andes	Mocho
73,0700	2	11	NAH-Costa	Nahuel Huapi
73,1786	2	12	NA-W-Costa	C. Nahuelbuta (Oeste)
73,0811	2	13	NA-E-Costa	C. Nahuelbuta (Este)
73,695	2	14	PEL-W-Costa	C. Pelada (Oeste)
73,6577	2	15	PEL-E-Costa	C. Pelada (Este)
73,2500	2	16	VAL-Costa	Valdivia
72,6833	3	17	PIC-Sur	Pichanco
72,7841	3	18	CHA-Sur	Chaitén
73,0177	3	19	BAL-Sur	Raúl Marín Balmaceda
72,6077	3	20	QUE-Sur	Queulat
72,5769	3	21	SIM-Sur	Río Simpson
73,3105	3	22	EXP-Sur	Bahía Exploradores
72,4544	3	23	AYS-Sur	Aysén

BIO ₈ (°C)	BIO ₇	BIO ₆ (°C)	BIO ₅ (°C)	BIO ₄	BIO ₃ (°C)	BIO ₂ (°C)	BIO ₁ (°C)	Altitud (m)	Latitud (° S)
7,9	26,7	2,1	28,8	475	51,5	13,8	13,1	190	35,6100
9,1	26	3,3	29,3	451,7	52,9	13,8	13,9	206	36,9000
6,7	23,6	2	25,6	395,7	56,8	13,4	10,9	144	38,7283
0,4	22,7	-3,6	19,1	385,7	56	12,7	5	100	39,5941
1,1	24,3	-3,7	20,6	408	56,4	13,7	5,5	118	39,0033
8,6	21,6	3,3	24,9	379	51,7	11,2	12,3	178	40,2227
8	20,5	3	23,5	372,7	50,1	10,3	11,7	167	40,7841
7,3	17,1	3	20,1	308,6	49,6	8,5	10,4	150	41,3930
-0,9	23,1	-4,9	18,2	430,2	54,4	12,6	4,3	103	40,24
1,8	20,6	-2,1	18,5	346	54,9	11,3	5,9	110	39,9775
9,7	20	4,4	24,4	305,7	55,6	11,1	12,6	177	37,8100
7,9	20,3	2,9	23,2	306	57,2	11,6	11	137	37,8563
6,8	21	1,9	22,9	325,3	56	11,8	10,1	154	38,0636
3,9	15,2	0,3	15,5	234	56,5	8,6	6,6	104	40,3141
7,6	14,8	3,3	18,1	222,5	57,2	8,5	9,6	112	40,2608
8,6	18,9	4,0	22,9	325,4	50,7	9,6	11,8	167	39,8100
5,7	19	1,3	20,3	358,4	51,2	9,7	9,4	145	42,1852
5,5	16,7	1,6	18,3	322	49,3	8,2	8,8	155	42,9744
7,3	15,2	3,8	19	305,6	45,9	7	10,5	149	43,8205
6,3	16,5	2,7	19,2	340,2	45,3	7,5	10	148	44,5958
4,2	16,3	0,7	17	349,7	44,3	7,2	8,1	142	45,5961
-3,1	16	-7	9	320,1	49,4	7,9	0,4	14	46,7536
4,0	16,8	0,5	17,3	361,5	44,4	7,5	8,1	131	45,6525

BIO ₁₉ (mm)	BIO ₁₈ (mm)	BIO ₁₇ (mm)	BIO ₁₆ (mm)	BIO ₁₅	BIO ₁₄ (mm)	BIO ₁₃ (mm)	BIO ₁₂ (mm)	BIO ₁₁ (°C)	BIO ₁₀ (°C)	BIO ₉ (°C)
539	29	29	570	99,4	9	228	932	7.5	19,2	19,2
565	47	47	629	90,5	10	245	1075	8.5	19,8	19,8
844	178	178	906	64,1	52	309	1886	6.2	16	16
559	102	102	559	67,1	25	210	1162	0.4	9,8	9,8
474	80	80	490	70,9	19	175	972	0.7	10,6	10,6
811	227	227	870	55,1	61	296	1953	7.8	17,1	17,1
783	249	249	856	50,5	75	296	1986	7.3	16,4	16,4
725	285	285	776	40,8	89	264	1973	6.8	14,3	14,3
363	71	71	363	65,5	16	139	753	-0.9	9,6	9,6
816	179	179	816	59,4	47	306	1799	1.8	10,3	10,3
740	77	77	796	84,5	22	286	1427	9	16,6	16,6
802	115	115	840	75,1	32	307	1617	7.4	14,9	14,9
726	102	102	749	75,5	28	277	1450	6.3	14,3	14,3
919	267	226	919	55,2	60	310	2166	3.9	9,5	9,5
901	210	210	923	57,8	62	326	2145	7	12,4	12,4
1017	211	211	107	64,8	61	376	2242	8.0	16,0	6,0
847	299	299	886	45,9	88	303	2140	5.1	13,9	13,9
932	360	345	951	43,5	107	339	2371	5	12,9	12,7
996	469	434	1037	36,2	135	362	2747	6.8	14,3	14,1
840	446	417	900	33,1	129	314	2447	5.8	14,3	14
697	425	409	750	29,3	124	278	2154	3.6	12,4	12
396	282	282	399	16,6	86	135	1363	-3.6	4,3	4,3
606	249	335	662	33,0	101	250	1834	3.5	12,5	10,0

2. Variación de rasgos foliares en el registro fósil

Se colectaron muestras foliares fósiles de *N. dombeyi* en el afloramiento Río Caunahué (40°S) (Figura 3, punto 6) del estrato más antiguo de la secuencia sedimentaria lacustre, que fue datado en 15.000 años de edad, y del más recientes, datado en 5.000 años, en el Verano del 2010. El material de cada estrato se almacenó y transportó envuelto en papel Film, luego se midió la densidad estomática de 10 hojas y el área foliar de 30 hojas usando el mismo protocolo que para las hojas actuales. Se utilizó una prueba de t-Student para evaluar si había diferencias significativas entre los estratos, con el programa Statistica, séptima versión.

3. Variación en la tolerancia al congelamiento

3. 1 Sitios de estudio

Este estudio se realizó en dos localidades, una ubicada en la Reserva Nacional Río Simpson (45°27' S, 72°19'W) y la otra en Valdivia (39°49' S, 73° 15'W) al final de la estación fría (Otoño–Invierno) del 2010 (Figura3, punto 16 y 23). En cada localidades colectaron ramas con hojas maduras, sanas, de tallo lignificado y expuestas al sol de 10 plántulas y 10 juveniles de *N. dombeyi* para estimar tolerancia al congelamiento, temperatura a la cual se produce el 50 % del daño foliar (LT50%), y para la extracción y determinación de la concentración de Prolina y Almidón.

3. 2 Medición de la temperatura a la que se produce el 50% del daño foliar (LT50%)

Ramas con los primeros 3 pares de hojas maduras fueron introducidas en bolsas herméticamente cerradas e incubadas en el baño refrigerante a siete temperaturas congelantes (-3°C, -6°C, -9°C, -11°C, -12°C, -13°C y -15°C) por 1,5 hrs. Las bolsas con ramas se removieron del baño refrigerante y se llevaron a 4°C por toda la noche para que se descongelaran. Para estimar el daño foliar se midió la fluorescencia de hojas adaptadas a la oscuridad con un fluorímetro Hansatech FMS2 y se estimó el porcentaje de fotoinhibición según Larcher (2000). Este se calculó como $\%FI=1-(FI_{final}- FI_{inicial})$, donde FI_{final} y $FI_{inicial}$ es la razón de la fluorescencia variable respecto a la máxima (FV/FM) al final y al inicio de cada tratamiento. La temperatura a cual se produce el 50% de daño en los tejidos de la hoja (LT_{50}) se estimó utilizando interpolación lineal (Bannister *et al*, 2005)

3. 3 Extracción y cuantificación de la Prolina

La prolina libre se determinó por medio de un método colorimétrico. Se tomaron 0,1 gr de materia fresca de hojas de *N. dombeyi*, y se machacaron en nitrógeno líquido. Se homogenizaron con 10ml de ácido sulfosalicílico al 3% y se centrifugaron por 2 minutos a 2500 rpm. A 2ml de extracto se le agregaron 2ml Ninhidrina Ácida y 2ml de Ácido Acético al 60%. Esta solución se llevó a 100°C por una hora, posteriormente se enfrió con hielo para detener la reacción. Finalmente la prolina se extrajo con 4 ml de tolueno.

La concentración de prolina se determinó por la comparación con una curva estándar de prolina pura (de entre 5µg/ml hasta 50 µg/ml) a una absorbancia de 520 nm. La Ninhidrina Acida fue preparada calentando 1,25 gr de Ninhidrina en 20 ml de Acido Fosfórico al 6M y 30 ml de Ácido Acético Glacial con agitación. Se utilizo el método modificado de Bates y colaboradores, 1973.

3.4 Extracción y cuantificación del Almidón

El Almidón se determinó por medio un método colorimétrico. Se tomaron 0,1 gr de materia fresca de hojas de *N. dombeyi*, se machacaron en nitrógeno líquido y se homogenizaron con 0,5 ml de de agua destilada. Posteriormente, se llevó a 100°C por 10 minutos para la gelatinización del almidón. Luego la solución fue centrifugada por 2 minutos a 2500 rpm para eliminar los restos de tejido no homogenizado. Se tomaron 0,1ml de sobrenadante y se le adicionaron 0,9ml de Etanol para precipitar el Almidón, después se centrifugó la solución por 5 minutos a 10000 rpm. A continuación se desechó el sobrenadante y el Almidón precipitado se resuspendió en 2ml de agua destilada en un Vortex por 10 minutos. Finalmente se tomó 0,2ml de la solución anterior agregándole 1,8 ml de agua destilada y 0,05ml de lugol. La concentración del Almidón se determinó por la comparación con una curva estándar de Almidón puro (de entre 5µg/µl hasta 50 µg/µl) a una absorbancia de 595nm. Se utilizo el método modificado de Dubois y colaboradores, 1959.

3. 5 Análisis estadísticos

Se comparó las LT50%, la concertación de prolina y de almidón de plántulas y juveniles provenientes de las dos localidades. Para esto se realizó una prueba de t-Student, con el programa Statistic, séptima versión.

RESULTADOS

1. Variación de los rasgos foliares de *N. dombeyi* a lo largo de su rango de distribución, y su relación con el clima y la filogeografía

El ANDEVA anidado mostró un efecto de los grupos filogeográficos sobre la densidad estomática, lo que se explicó por diferencias significativas en este rasgo foliar entre los grupos filogeográficos 1 y 3 (ANDEVA_(grupos filogeográficos): $F_{0,05, 2}=7,102$ $p=0,01$), además la densidad estomática mostró diferencias interpoblacionales al interior del grupo filogeográfico 2 (ANDEVA_{(grupos filogeográficos(poblaciones))}: $F_{0,05, 20}=2,430$ $p=0,02$) entre las poblaciones VAL-Costa con VPR-Andes y TER-Andes (Tabla 3).

El ANDEVA anidado sobre el área foliar no mostró un efecto de los grupos filogeográficos (ANDEVA_(grupos filogeográficos): $F_{0,05, 2}=2,1$ $p=0,125$), pero si mostró un efecto de las poblaciones al interior del grupo filogeográfico 2 (ANDEVA_{(grupos filogeográficos(poblaciones))}: $F_{0,05, 20}=2,339$ $p=0,02$), debido a las diferencias significativas en el área foliar entre las poblaciones PEL-W-Costa con SIM-Sur, VAL-Costa, NA-E-Costa, MOQ-Andes, PUE-Andes, CON-Andes y esta última población con MOC-Andes (Tabla 3).

El ANDEVA anidado sobre el LMA no mostró un efecto de los grupos filogeográficos (ANDEVA_(grupos filogeográficos): $F_{0,05, 2}=1,39$ $p=0,152$), pero si lo hizo en el caso de las poblaciones al interior del grupo filogeográfico 2 (ANDEVA_{(grupos filogeográficos(poblaciones))}:

$F_{0,05, 20}=17,59$ ($p<0,0001$), siendo SMA-Andes, PEL-W-Costa y VAL-Costa las poblaciones que se diferencian significativamente de más poblaciones pertenecientes a su grupo filogeográfico (Tabla 3).

Tabla 2. Tabla con los resultados entregados por el ANDEVA Anidado para el área foliar, LMA y densidad estomática, al comparar las 23 poblaciones. Los Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$).

Densidad Estomática			
	GL	F	P
Grupos filogeográficos	2	7,102	0,01*
Grupos filogeográficos (población)	20	2,430	0,02*
Área foliar			
	GL	F	P
Grupos filogeográficos	2	2,1	0,125
Grupos filogeográficos (población)	20	2,339	0.002*
LMA			
	GL	F	P
Grupos filogeográficos	2	1,39	0,252
Grupos filogeográficos (población)	20	17, 59	$P<0,0001$ *

Tabla 3. Muestra los valores promedio \pm DE del área foliar, LMA y densidad estomática de las 23 poblaciones muestreadas. Además de los grupos filogeográficos de las mismas. Las letras representan las diferencias significativas en los rasgos morfológicos a nivel interpoblacional encontradas por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Población	Área foliar (mm ²)	D. Estomática (estomas/mm ²)	LMA (g/m ²)
VIL-Andes	193,33 \pm 67,98 ab	340,53 \pm 42,21 ab	129,10 \pm 13,83 abcdfghl
TER-Andes	169,98 \pm 55,25 ab	340,57 \pm 52,43 a	115,39 \pm 14,88 abcdfghijk
CON-Andes	198,84 \pm 86,97 a	280,70 \pm 86,29 ab	115,15 \pm 24,69 abcdfghijk
PUE-Andes	177,21 \pm 74,09 a	261,03 \pm 49,31 ab	92,66 \pm 15,71 afhijk
MOQ-Andes	178,88 \pm 48,87 a	335,33 \pm 42,06 ab	114,98 \pm 24,36 abcdfghijk
CAU-Andes	184,61 \pm 70,70 ab	316,30 \pm 53,91 ab	106,77 \pm 19,00 abcdfghijk
PUY-Andes	165,69 \pm 70,62 ab	314,27 \pm 12,05 ab	130,82 \pm 20,02 abcdfghl
VPR-Andes	161,79 \pm 65,58 ab	343,70 \pm 74,06 a	154,35 \pm 21,44 bcdlm
SMA-Andes	168,85 \pm 47,02 ab	323,37 \pm 40,39 ab	172,56 \pm 17,59 flm
MOC-Andes	136,68 \pm 60,42 b	315,67 \pm 45,39 ab	120,04 \pm 16,39 abcdfghijk
NAH-Costa	163,10 \pm 59,84 ab	257,90 \pm 17,45 ab	95,72 \pm 22,53 adfghijk
NA-W-Costa	172,95 \pm 75,98 ab	312,00 \pm 42,55 ab	124,72 \pm 16,08 abcdfghijk
NA-E-Costa	196,48 \pm 62,06 a	322,77 \pm 37,56 ab	97,43 \pm 12,14 acdfghijk
PEL-W-Costa	115,53 \pm 41,56 b	292,03 \pm 40,92 ab	169,82 \pm 35,31 lm
PEL-E-Costa	164,29 \pm 46,42 ab	315,13 \pm 59,12 ab	130,40 \pm 20,99 abcdfghl
VAL-Costa	185,67 \pm 62,58 a	239,22 \pm 42,19 b	87,82 \pm 13,19 m
PIC-Sur	165,12 \pm 79,20 ab	311,43 \pm 21,38 ab	112,46 \pm 13,80 abcdfghijk
CHA-Sur	150,67 \pm 46,90 ab	300,07 \pm 34,14 ab	126,69 \pm 20,19 abcdfghkl
BAL-Sur	170,26 \pm 60,25 ab	277,63 \pm 55,27 ab	131,78 \pm 19,18 abcdfghl
QUE-Sur	167,58 \pm 62,95 ab	283,04 \pm 32,71 ab	135,97 \pm 19,16 abcdfghl
SIM-Sur	176,48 \pm 66,86 a	277,27 \pm 37,22 ab	125,82 \pm 18,82 abcdfghkl
EXP-Sur	171,83 \pm 68,75 ab	250,90 \pm 37,59 ab	123,58 \pm 27,13 abcdfghjk
AYS-Sur	171,99 \pm 41,53 ab	253,33 \pm 42,01 ab	111,60 \pm 18,30 bacdfghijk

El análisis de componentes principales (Figura 4) evidencia que el primer eje explicó el 43,6% de la varianza y se asoció principalmente con las variables de precipitación, incluyendo: precipitación del mes más seco (BIO₁₄), estacionalidad de la precipitación (BIO₁₅), precipitación del cuarto más seco (BIO₁₇), precipitación del cuarto más cálido (BIO₁₈), oscilación de la temperatura media mensual (BIO₂) y oscilación de la temperatura anual (BIO₇) (Tabla 4). El segundo eje del PCA explicó un 39,6% de la

varianza y se asoció principalmente con las variables de temperatura incluyendo la temperatura media anual (BIO₁), la temperatura mínima del mes más frío (BIO₆), la temperatura media del cuarto más húmedo (BIO₈) y la temperatura media del cuarto más frío (BIO₁₁) (Tabla 4).

El GLM para la densidad estomática que tuvo el mejor AIC (225,22) fue el que consideró solo los grupos filogeográficos como variable independiente, este correlacionó marginalmente e inversamente al rasgo morfológico con los grupos filogeográficos (B= -61,44, p=0,0628) y explicó un 23% de la varianza (Tabla 4 y 5). En el caso del área foliar el GLM que tuvo mejor AIC (201,12) fue el algoritmo que incluyó los grupos filogeográficos y los dos primeros ejes del PCA, con un 23% de la varianza, y correlacionó significativamente el área foliar con el primer eje del PCA, asociado negativamente con las precipitaciones de verano (B= 4,53, p=0,0328) (Tablas 4 y 5).

El GLM para el LMA que tuvo el mejor AIC (209,9) fue el algoritmo que incluyó los grupos filogeográficos, los dos primeros ejes del PCA, además la interacción entre el eje 2 del PCA y los grupos filogeográficos, este GLM explicó un 38% de la varianza y no correlacionó significativamente el área foliar con ninguna de las variables independientes consideradas, por lo que ninguno de estos factores daría cuenta de las variaciones presentadas por el LMA en el gradiente latitudinal (Tabla 4 y 5).

Tabla 4. Se informa la contribución de las diecinueve variables bioclimáticas de las 23 poblaciones de *Nothofagus dombeyi* en los primeros dos ejes arrojados por el PCA.

VARIABLES BIOLIMÁTICAS	EJE 1	EJE 2
Temperatura media anual (BIO ₁)	0,322939	0,930503
Oscilación de la temperatura media mensual (BIO ₂)	0,952901	-0,110960
Isoterma (BIO ₃)	0,609330	-0,135050
Estacionalidad de la temperatura (BIO ₄)	0,647061	-0,165806
Temperatura máxima del mes más cálido (BIO ₅)	0,747856	0,633644
Temperatura mínima del mes más frío (BIO ₆)	0,006398	0,985838
Oscilación de la temperatura anual (BIO ₇)	0,934704	-0,069535
Temperatura media del cuarto más húmedo (BIO ₈)	0,180587	0,966352
Temperatura media del cuarto más seco (BIO ₉)	0,491639	0,835987
Temperatura media del cuarto más cálido (BIO ₁₀)	0,456396	0,845826
Temperatura media del cuarto más frío (BIO ₁₁)	0,194558	0,967151
Precipitación anual (BIO ₁₂)	-0,799164	0,553867
Precipitación del mes más húmedo (BIO ₁₃)	-0,355023	0,831156
Precipitación del mes más seco (BIO ₁₄)	-0,927397	0,200680
Estacionalidad de la precipitación (BIO ₁₅)	0,921590	0,212573
Precipitación del cuarto más húmedo (BIO ₁₆)	-0,341815	0,463862
Precipitación del cuarto más seco (BIO ₁₇)	-0,937051	0,185531
Precipitación del cuarto más cálido (BIO ₁₈)	-0,929947	0,207436
Precipitación del cuarto más frío (BIO ₁₉)	-0,439026	0,744508

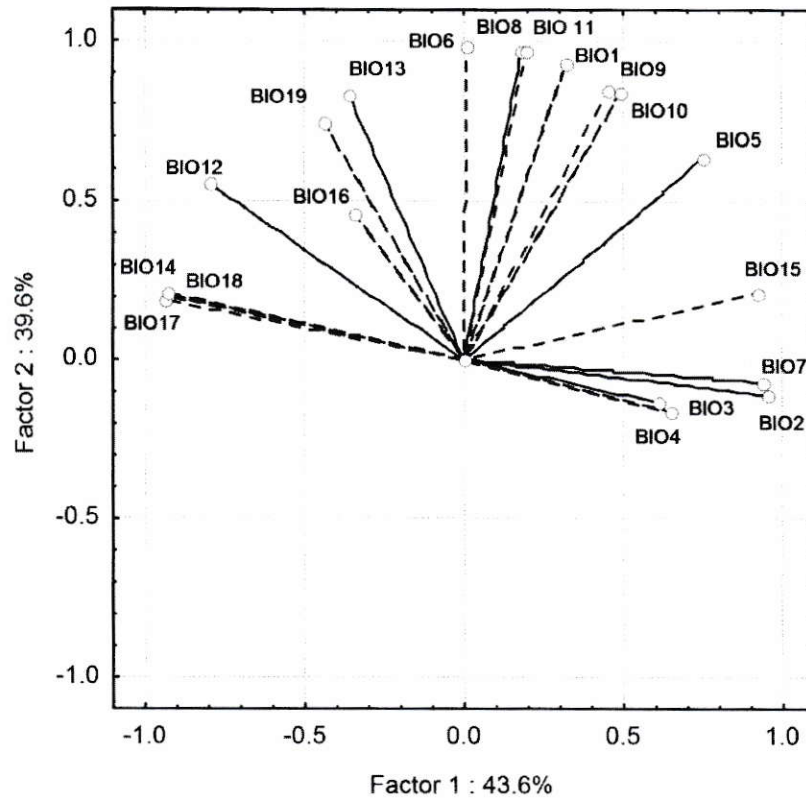


Figura 4. Representación gráfica del PCA, donde las variables bioclimáticas analizadas son: temperatura media anual (BIO₁), oscilación de la temperatura media mensual (BIO₂), isoterma (BIO₃), estacionalidad de la temperatura (BIO₄), temperatura máxima del mes más cálido (BIO₅), temperatura mínima del mes más frío (BIO₆), oscilación de la temperatura anual (BIO₇), temperatura media del cuarto más húmedo (BIO₈), temperatura media del cuarto más seco (BIO₉), temperatura media del cuarto más cálido (BIO₁₀), temperatura media del cuarto más frío (BIO₁₁), la precipitación anual (BIO₁₂), precipitación del mes más húmedo (BIO₁₃), precipitación del mes más seco (BIO₁₄), estacionalidad de la precipitación (BIO₁₅), la precipitación del cuarto más húmedo (BIO₁₆), la precipitación del cuarto más seco (BIO₁₇), precipitación del cuarto más calido (BIO₁₈), precipitación del cuarto más frío (BIO₁₉). El eje 1 explica el 43,6% de la varianza y el eje 2 el 39,6%.

Tabla 5. Resultados entregados por el Stepwise, de el AIC y R^2 para el GLM mas simple y que mejor se ajusta a la muestra de cada rasgo morfológico. Los Asteriscos indican relaciones estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$).

	Densidad Estomática	Área Foliar	LMA
AIC	225,22	201,12	209,9
R^2	0,23	0,32	0,35

Tabla 6. Resultados entregados por el GLM, para las tres variables morfológicas con respecto a los grupos filogeográficos y los dos primeros ejes extraídos del PCA. Los Asteriscos indican relaciones estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$).

Densidad Estomática				
	GL	t-valor	P	B
Grupos filogeográficos b	22	-1,191	0,2477	-35,87
Grupos filogeográficos c	22	-1,970	0,0628	-61,44
Área Foliar				
	GL	t-valor	P	B
Grupos filogeográficos b	22	0,037	0,9706	0,7412
Grupos filogeográficos c	22	0,9706	0,4108	21,8649
Eje 1	22	0,0328	0,0328 *	4,5323
Eje 2	22	0,0748	0,0748	2,9975
LMA				
	GL	t-valor	P	B
Grupos filogeográficos b	22	-1,048	0,3095	-26,368
Grupos filogeográficos c	22	-1,424	0,1724	-47,266
Eje 1	22	-1,961	0,0665	-4,613
Eje 2	22	-0,586	0,5656	-1,693
Grupos filogeográficos b * Eje 2	22	-1,290	0,2142	-4,533

De acuerdo a la modelación de nicho climático para *N. dombeyi*, las variables bioclimáticas más relevantes para la presencia de esta especie, son la precipitación del cuarto más frío (BIO₁₉) con un 39% de contribución y la temperatura media del cuarto más húmedo (BIO₈) con un 25.8% de contribución para la presencia del coigüe (Tabla 7).

El GLM para la densidad estomática que tuvo el mejor AIC (222,78) fue el algoritmo que consideró los grupos filogeográficos y su interacción con la precipitación del cuarto más frío (BIO₁₉) como variables independientes, este GLM correlacionó significativamente al rasgo morfológico con la precipitación del cuarto más frío (B= 62,79, p=0,0195) y explicó un 41% de la varianza (Tabla 8 y 9). En el caso del área foliar el GLM que tuvo mejor AIC (210,34) fue el algoritmo que incluyó la temperatura media del cuarto más húmedo (BIO₈), la precipitación del cuarto más frío (BIO₁₉), además de la interacción entre ambas variables independientes, este GLM explicó un 6% de la varianza y correlacionó significativa e inversamente el área foliar con la precipitación del cuarto más frío (B= -0,112713, p=0,00534, Tabla 8 y 9).

El GLM para el LMA que tuvo el mejor AIC (197,03) fue el que consideró solo la temperatura media del cuarto más húmedo (BIO₈) como variable independiente, este GLM explicó un 38% de la varianza y no correlacionó significativamente el área foliar con la variable climática (B= -1,495, p=0,273, Tabla 8 y 9).

En resumen, estos resultados muestran una asociación de la variación de la densidad estomática con la pertenencia a diferentes grupos filogeográficos; que el área foliar exhibe una asociación entre la variación de este rasgo y las precipitaciones; y que el LMA del coigüe en el gradiente latitudinal no muestra asociación con ninguna de las variables climáticas, filogeográficas o interacciones entre ambos tipos de variables independientes consideradas por este estudio.

Tabla 7. Porcentaje de contribución de las 19 variables bioclimáticas en la presencia de *Nothofagus dombeyi* en su rango de distribución, entregado por MAXENT. Siendo las variables bioclimáticas que más contribuyen la Precipitación del cuarto más frío (BIO₁₉) con un 39% y la Temperatura media del cuarto más húmedo (BIO₈) en un 25,8%.

VARIABLES BIOLIMÁTICAS	Porcentaje de contribución
Precipitación del cuarto más frío (BIO ₁₉)	39
Temperatura media del cuarto más húmedo (BIO ₈)	25,8
Temperatura media del cuarto más cálido (BIO ₁₀)	5,5
Estacionalidad de la temperatura (BIO ₄)	4,6
Precipitación anual (BIO ₁₂)	4,6
Precipitación del cuarto más cálido (BIO ₁₈)	4,2
Oscilación de la temperatura anual (BIO ₇)	2,8
Temperatura máxima del mes más cálido (BIO ₅)	2,5
Estacionalidad de la precipitación (BIO ₁₅)	2,3
Temperatura media del cuarto más seco (BIO ₉)	1,7
Temperatura mínima del mes más frío (BIO ₆)	1,1
Temperatura media anual (BIO ₁)	1
Isoterma (BIO ₃)	1
Temperatura media del cuarto más frío (BIO ₁₁)	1
Precipitación del mes más húmedo (BIO ₁₃)	0,8
Precipitación del cuarto más húmedo (BIO ₁₆)	0,7
Oscilación de la temperatura media mensual (BIO ₂)	0,5
Precipitación del mes más seco (BIO ₁₄)	0,4
Precipitación del cuarto más seco (BIO ₁₇)	0,2

Tabla 8. Resultados entregados por el Stepwise, de el AIC y R² para el GLM mas simple y que mejor se ajusta a la muestra de cada rasgo morfológico. Los Asteriscos indican relaciones estadísticamente significativas (P ≤ 0,05).

	Densidad Estomática	Área Foliar	LMA
AIC	222,78	210,34	197,03
R ²	0,41	0,06	0,38

Tabla 9. Resultados entregados por GLM, para las tres variables morfológicas con respecto a los grupos filogeográficos, la temperatura media del cuarto más húmedo (BIO₈) y Precipitación del cuarto más frío (BIO₁₉).

Densidad Estomática				
	GL	t-valor	P	B
Grupo filogeográficos b	22	1,270	0,0195 *	62,79662
Grupo filogeográficos c	22	-2,564	0,2203	-79,03493
BIO ₁₉	22	1,523	0,1451	0,07993
Grupo filogeográficos b * BIO ₁₉	22	-2,347	0,0605	-0,15542
Área Foliar				
	GL	t-valor	P	B
BIO ₈	22	-1,071	0,29756	-3,815683
BIO ₁₉	22	-3,144	0,00534 *	-0,112713
BIO ₈ * BIO ₁₉	22	1,988	0,06145	0,011437
LMA				
	GL	t-valor	P	B
BIO ₈	22	-1,126	0,273	-1,495

2. Variación de los rasgos foliares en el registro fósil

Al comparar hojas fósiles de los estratos datados en 5.000 y 15.000 años del afloramiento fósil Río Caunahué se encontraron diferencias significativas en el área foliar (Prueba t, $t(47) = -6,9$ $p < 0,001$), pero no en la densidad estomática (Prueba t, $t(21) = -0,53$ $p = 0,6$) (Figura 5, 6 y Tabla 10). El área de las hojas fechadas en 5.000 años fue 3 veces mayor que el de las hojas más antiguas.

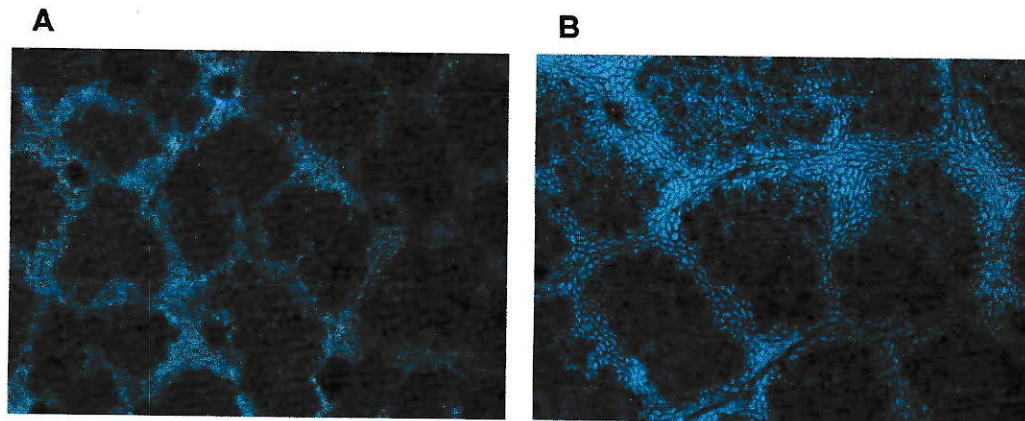


Figura 5. Fotografías de cutículas foliares provenientes (aumento 10 x): del afloramiento fósil Río Caunahué (A) y de la población actual CAU-Andes (B).

Tabla 10. Resultados obtenidos de la prueba de t-Student para el área foliar y densidad estomática, al comparar hojas fósiles del afloramiento Río Caunahué con hojas actuales de la población CAU-Andes. El Asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$).

Variables morfológicas	t-valor	GI	P
Área foliar (mm^2)	-6,90208	47	> 0,001*
D. estomática (Estomas/ mm^2)	-0,52697	21	0,6037

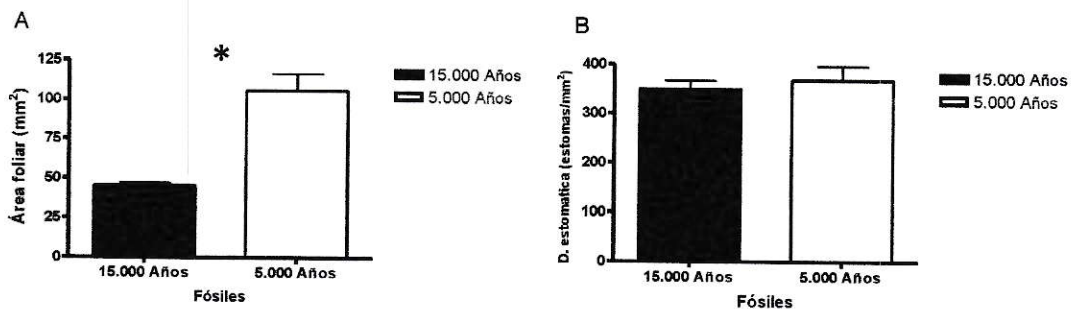


Figura 6. Representación gráfica del promedio \pm EE del área foliar (A) y de la densidad estomática (B) correspondiente a el afloramiento fósil Río Caunahué y la población actual CAU-Andes. El Asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$).

3. Variación en la tolerancia al congelamiento

Se encontraron diferencias significativas entre individuos provenientes de Aysén y de Valdivia en la tolerancia al congelamiento (t-student) (Tabla 11). La temperatura a la cual ocurrió el 50% del daño foliar (LT50) fue de $-12,7^{\circ}\text{C}$ en las plántulas de Aysén y solo de $-8,6^{\circ}\text{C}$ en las de Valdivia. La tolerancia al congelamiento de los juveniles fue menor que el de las plántulas en ambas localidades, siendo de $-11,8^{\circ}\text{C}$ en Aysén y sólo de $-8,8^{\circ}\text{C}$ en Valdivia (Figura 7). También se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de prolina (Tabla 12). En el caso de las plántulas se cuantificaron las mayores concentraciones de este aminoácido en la población de Aysén, y en el de los juveniles en Valdivia (Figura 8). También se observaron diferencias en las concentraciones de almidón, pero solo en los individuos juveniles (Tabla 12) siendo la población de Aysén la que exhibió las mayores cantidades de este compuesto (Figura 8).

Tabla 11. Resultados obtenidos de la prueba de t-Student para la LT50% en plántulas y juveniles, al comparar la población de Aysén proveniente del refugio ubicado al interior de la lengua glacial y la población de Valdivia originaria del refugio situado al norte de los hielos. Los Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$).

	t-valor	GL	P
plántulas	9,283169	16	$P < 0,0001$ *
juveniles	7,879839	17	$P < 0,0001$ *

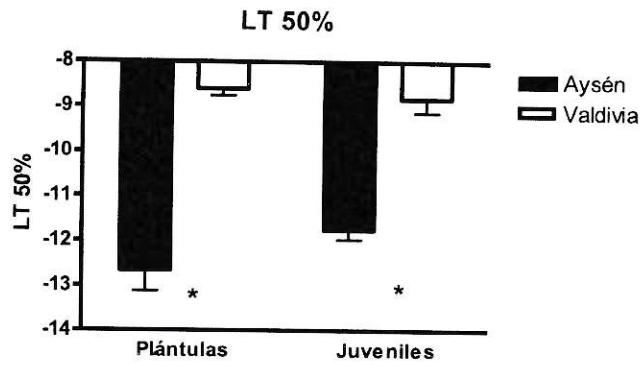


Figura 7. Representación gráfica del promedio \pm EE de la temperatura a la que se produce el 50% del daño foliar (LT50%), en plántulas y juveniles de las poblaciones de Aysén (proveniente del refugio ubicado al interior de la lengua glacial) y Valdivia (originaria del refugio situado al norte de los hielos). Los Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$)

Tabla 12. Resultados de la prueba de t-Student para las concentraciones de prolina y almidón, en plántulas y juveniles, al comparar la población de Aysén proveniente del refugio ubicado al interior de la lengua glacial y la población de Valdivia originaria del refugio situado al norte de los hielos. Los Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$).

	Prolina			Almidón		
	t-valor	Gl	P	t-valor	gl	P
plántulas	2,381895	17	0,0292*	-0,095807	18	0,9247
juveniles	-4,61548	18	0,0002*	4,394389	18	0,0004 *

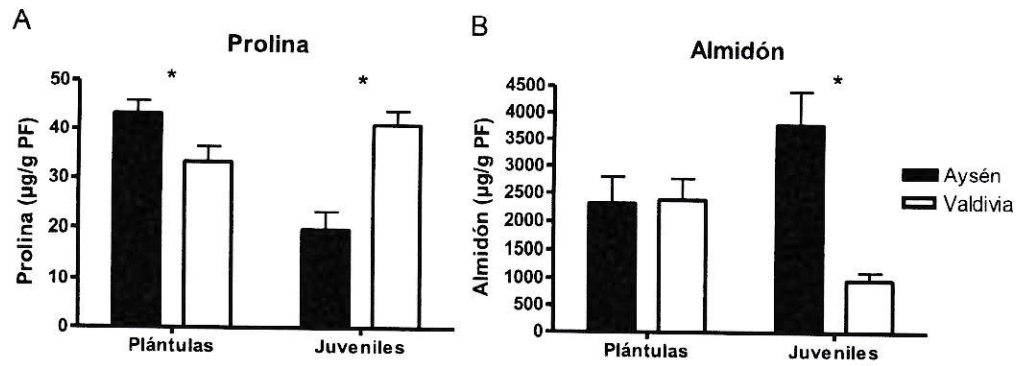


Figura 8. Representación gráfica de la concentración promedio \pm EE de prolina en plántulas y juveniles (A), y de almidón en plántulas y juveniles (B), de las poblaciones de Aysén (proveniente del refugio ubicado al interior de la lengua glacial) y Valdivia (originaria del refugio situado al norte de los hielos). Los Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$).

DISCUSIÓN

Los tres rasgos morfológicos estudiados (área foliar, LMA y densidad estomática) mostraron una variación significativa entre las poblaciones de *N. dombeyi* pertenecientes al grupo filogeográfico 2, pero la variación de la densidad estomática es la única de estos tres rasgos foliares que además sugiere un posible efecto histórico atribuible al efecto de la fragmentación y aislamiento causado por las glaciaciones del UMG sobre el coigüe. Consistentemente con lo anterior datos de 10.000 años de registro fósil de la localidad Río Caunahué sugieren que la densidad estomática no habría variado a pesar de la variación climática sufrida por los coigües que habitaban la zona durante la época de depositación de Río Caunahué. Estos resultados se contraponen a numerosos estudios con hojas fósiles y muestras de herbarios que documentan que la densidad estomática es capaz de adaptarse a cambios ambientales locales y globales en todas las escalas de tiempo, desde décadas a milenios (Woodward & Bazzaz, 1988; Peñuelas & Matamala, 1990; Woodward & Kelly, 1995; Beerling & Kelly 1997; Hetherington & Woodward, 2003) y también con varios estudios que muestran variaciones intraespecíficas asociados a gradientes ambientales (Hovenden & Brodribb, 2000; Limin *et al.*, 2007; Premoli & Brewer, 2007; Figueroa *et al.*, 2010). Una posible explicación para los resultados que muestran que la densidad estomática fósil no parece responder ajustadamente al clima, podría ser que este rasgo foliar sea más conservado en esta especie siempre verde, lo

cual es consistente con la idea sugerida anteriormente de que este rasgo foliar pareciese estar mostrando una huella histórica de las glaciaciones del UMG en el coigüe.

En el caso del área foliar los datos de hojas fósiles, indican que este rasgo foliar ha variado en los últimos 15.000 años. De acuerdo a nuestros resultados, las hojas de coigüe eran probablemente de menor tamaño hace 15.000 años, cuando de acuerdo a estimaciones de obtenidas con análisis de coexistencia, el clima era más frío (Temperatura media anual =9,98 °C) y ligeramente más lluvioso (Precipitación media anual =185mm) que hace 5.000 años atrás (Temperatura media anual = 11, 47°C, y Precipitación media anual =166mm) en la localidad fósil Río Caunahué (L.F. Hinojosa datos no publicados). Nuestros resultados con respecto al área foliar actual del coigüe en las 23 poblaciones estudiadas sugieren un comportamiento contrario al descrito en las hojas fósiles, pues los modelos de GLM sobre este rasgo indican que el área foliar disminuiría con las precipitaciones del cuarto más frío (al considerar las variables climáticas que de acuerdo al modelamiento de MAXENT) y las precipitaciones de verano (al considerar las variables bioclimáticas resumidas en análisis de componentes principales). A diferencia de la densidad estomática, el área foliar en el coigüe pareciese ser un rasgo bastante lábil, pues nuestros datos sugieren que este rasgo en el pasado respondía ajustadamente al clima, a diferencia de la respuesta que parece tener en la actualidad. Esta posible rapidez en la respuesta del tamaño de la hoja en el coigüe podría ser una posible explicación a la ausencia de huella histórica en este rasgo foliar sugerida por los datos.

Similarmente, los datos de LMA obtenidos por este estudio indican que la respuesta de en este rasgo morfológico en el coigüe no parece mostrar un comportamiento ajustado con el clima que habita esta especie siempre verde.

Los resultados de área foliar y LMA para el coigüe en la actualidad indicarían una tendencia contraria a lo observado en otras especies, pues en general se ha documentado que en zonas de menor disponibilidad hídrica en climas fríos las especies vegetales presentan menores áreas foliares (Poblete *et al* 1991; Cordell *et al.*, 1998; Cordell *et al.*, 2000; Carlson *et al.*, 2010) y mayores LMA (Vitousek & Matson, 1990; Cordell *et al.*, 1998; Carlson *et al.*, 2010), como estrategia para disminuir la evapotranspiración y mejorar conservación del recurso hídrico (Poblete *et al* 1991; Carlson *et al.*, 2010)

Ya que los resultados obtenidos en este estudio sugieren que ni el área foliar ni el LMA están respondiendo ajustadamente al clima ofreciendo una ventaja a *N. dombeyi* frente a la deshidratación en los climas en el que la disponibilidad del recurso hídrico es menor, es probable que otros rasgos funcionales le estén permitiendo disminuir la pérdida de agua a esta especie, como puede ser la regulación de la conductancia estomática (Hetherington & Woodward, 2003), u otros mecanismos fisiológicos como la acumulación de deshidrinas de 47kDa que actúan impidiendo la deshidratación celular (Gallardo-Cerda *et al.*, 2012)

Aunque el aislamiento sufrido por las poblaciones de *N. dombeyi* en condiciones climáticas contrastantes durante las glaciaciones del Cuaternario pareciera no haber causado efectos sobre la respuesta del LMA en el coigüe, probablemente por el comportamiento desajustado de este rasgo con el clima, tal vez sí los tuvo sobre los

rasgos fisiológicos como la tolerancia al congelamiento. Nuestros datos sugieren que la temperatura a la que ocurrió el 50% de daño foliar (LT50%) fue menor en los individuos de Aysén, tanto en plántulas como en juveniles. Estos resultados son consistentes con lo que se esperaba, pues esta población sobrevivió al último máximo glacial (UMG) en una pequeña área libre de hielo, rodeada de glaciares y en condiciones climáticas muy desfavorables. Se hace necesaria, sin embargo, la realización de estudios de jardín común, para evaluar si las diferencias en la tolerancia al congelamiento observadas en terreno se mantiene, o son solo consecuencia de plasticidad fenotípica.

Los mecanismos fisiológicos que podrían estar tras las diferencias en las tolerancias al congelamiento no son del todo claros. Se ha descrito que un efectivo mecanismo protector del frío es el aumento en la síntesis y la acumulación de solutos compatibles, como azúcares y prolina (Meza-Basso *et al.*, 1986; Buchanan, 2001; Azcón-Bieto, 2008). De acuerdo a lo esperado, las plántulas de la población de Aysén expuesta a menores temperaturas invernales y la más tolerante al congelamiento según este estudio, pareciesen mostrar las mayores concentraciones de prolina. No se detectó, sin embargo, diferencias en los niveles de almidón, que pudiesen estar asociados a un aumento de carbohidratos monoméricos como ha sido descrito en trabajos previos (Reyes-Díaz *et al.*, 2005). Contrario a lo esperado, los datos obtenidos de los individuos juveniles de Aysén sugieren que estos individuos exhiben menores niveles de prolina y mayores niveles de almidón que los individuos de Valdivia. Este comportamiento inesperado podría deberse, a que los individuos juveniles de la población expuesta a mayores temperaturas invernales, posiblemente puedan estar sufriendo otros tipos de

estrés que también involucren aumento de solutos compatibles como estrés hídrico y salino (Delauney & Verma, 1993; Claussen, 2005; Chen *et al.*, 2007).

CONCLUSIÓN

Pareciese ser que el aislamiento y contrastantes condiciones climáticas a las que persistió *Nothofagus dombeyi* durante las glaciaciones del Cuaternario y en especial a las del UMG probablemente solo habrían tenido efectos sobre la densidad estomática, Los otros dos rasgos morfológicos analizados en este estudio, área foliar y LMA, pareciesen no mostrar huellas históricas, una probable explicación a esta ausencia de efectos históricos de las Glaciaciones sea la rápida respuesta al clima que presenta el área foliar y la respuesta desajustada con respecto al clima que parecen exhibir en la actualidad ambos rasgos funcionales en el coigüe.

Aunque el aislamiento sufrido por las poblaciones de *N. dombeyi* en condiciones climáticas contrastantes durante las glaciaciones del Cuaternario solo haya causado efectos sobre la densidad estomática en el coigüe, tal vez sí los tuvo sobre los rasgos fisiológicos como la tolerancia al congelamiento (LT50%), pues este rasgo sí responde ajustadamente al clima en que se encuentran inmersos los individuos. Por último, los mecanismos probablemente envueltos en la tolerancia al congelamiento, como la acumulación de prolina y monómeros de almidón, no serian consistentes en todos los casos con los individuos que exhiben mayores tolerancias al congelamiento, muy probablemente por enmascaramiento de su respuesta al clima por otras situaciones de estrés vegetal.

REFERENCIAS

- Acosta, M & Premoli, A. 2010. Evidence of chloroplast capture in South American *Nothofagus* (subgenus *Nothofagus*, Nothofagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(1): 235-242.
- Alberdi, M.; Weinberger, P.; Oliva, M and Romero, M. 1974. "Ein Beitrag zur chemischen Kennzeichnung des Skleromorphie-Grades von Blättern immergrüner Gehölze". *Beitr. Biol. Pflanzen*, 305-320.
- Alberdi, M. 1987. Ecofisiología de las especies Chilenas del genero *Nothofagus*. *Bosque*, 77-84.
- Alberdi, M.; Meza-Basso, L.; Fernández, J and Romero, M. 1988. Seasonal changes in carbohydrate content and frost resistance of leave of *Nothofagus dombeyi*. *Phytochemistry*, 759-763.
- Alberdi, M.; Meza-Basso, L.; Fernandez, J.; Criti, R.; Romero, M and Rios, D. 1990. Lipid changes in cold hardened leaves of *Nothofagus dombeyi*. *Phytochemistry*, 2467-2471.
- Alberdi, M.; Meza-Basso, L.; Fernandez, J.; Criti, R and Romero, M. 1991. Lipid composition of cloroplasts from cold-acclimated and non-acclimated *Nothofagus dombeyi*. *Phytochemistry*, 763-768.
- Azcón-Bieto, J., Talon, M. 2008. *Fundamentos de la Fisiología Vegetal*. Editorial McGraw-HILL. Madrid, España. pp 577-594.

- Bannister, P.; Maegli, T.; Dickinson, K.; Halloy, S.; Knight, A.; Lord, J.; Mark, A & Spencer K. 2005. Will loss of snow cover during climatic warming expose New Zealand alpine plants to increased frost damage? *Oecologia*, 144: 245–256.
- Bates, L.; Waldren, R & Teare, I. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39:205 –207.
- Beerling, D & Kelly, C. 1997. Stomatal density responses of temperate woodland plants over the past seven decades of CO₂ increase: a comparison of Salisbury (1927) with contemporary data. *American Journal of Botany*, 84:1572–1583.
- Bekessy, S.; Allnutt, T.; Premili, A.; Lara, A.; Ennos, M.; Burgman, M.; Cortez, M and Newton, A. 2002. Genetic variation in the vulnerable and endemic Monkey Puzzle tree, detected using RAPDs. *Heredity*, 88: 243-249.
- Buchanan, B.; Gruissem, W and Jones, R. 2001. *Biochemistry & molecular biology of plants*. American society of plant physiologists, Rockville, Maryland, USA. pp 1164-1176.
- Carlson, J.; Holsinger, K & Prunier, R. 2010. Plant responses to climate in the cape floristic region of south africa: evidence for adaptive differentiation in the proteaceae. *Evolution*, 65(1): 108-124.
- Claussen, W. 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants .*Plant Science*, 168: 241–248.
- Chen, Z.; Cuin, T.; Zhou, M.; Twomey, A.; Naidu, B and Shabala, S. 2007. Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(16): 4245– 4255.

- Cordell, S.; Goldstein, G.; Mueller-Dombois, D.; Webb, D & Vitousek, P. 1998. Physiological and morphological variation in *Metrosideros polymorpha*, a dominant Hawaiian tree species, along an altitudinal gradient: the role of phenotypic plasticity. *Oecologia*, 113(2): 188-196.
- Cordell, S.; Goldstein, G.; Melcher, P & Meinzer, F. 2000. Photosynthesis and Freezing Avoidance in Ohia (*Metrosideros polymorpha*) at Treeline in Hawaii. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 3(4): 381- 387.
- Delauney, A & Verma, D. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The plant Journal*, 4 (2): 215-223.
- Denton, G.; Lowell, T.; Heusser, C.; Schluchter, C.; Andersen, B.; Heusser, L.; Moreno, P & Marchant, D. 1999. Geomorphology, stratigraphy, and radiocarbon chronology of Illanquihue drift in the area of the southern lake district, seno Reloncavi, and isla grande de Chiloe, Chile. *Geografiska Annaler Series a-Physical Geography*, 81 (2):167-22.
- Dinis, L.; Peixoto, F.; Pinto, T.; Costa, R.; Bennett, R and Gomez- Laranjo, J. 2011. Study of morphological and phonological diversity in chestnut tree (“Judia” variety) as a function of temperature sum. *Environmental and Experimental Botany*, 70: 110-120.
- Donoso, C. 2006. Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina : autoecología. Marisa Cúneo ediciones. Valdivia. Chile, 423-232.
- Dubois, M.; Gilles K.; Hamilton.; J, Rebes & Smith, P. 1959. “Complex carbohydrates”. In: *Methods in Enzimology* (L. neufeld 1996) 8: 93-95.

- Fajardo, A & Piper, F. 2011. Intraspecific trait variation and covariation in a widespread tree species (*Nothofagus pumilio*) in southern Chile. *New Phytologist*, 189: 259-271.
- Fetcher, N.; Strain, B & Orberbauer, F. 1983. Effects of light on the growth, leaf morphology and water relations of seedlings of two species of tropical tree. *Oecologia*, 50: 314-319.
- Figueroa, J.; Cabrera, H.; Queirolo, C & Hinojosa, F. 2010. Variability of water relations and photosynthesis in *Eucryphia cordifolia* Cav. (Cunoniaceae) over the range of its latitudinal and altitudinal distribution in Chile. *Tree Physiology*, 30: 574-585.
- Gallardo-Cerda, J.; Bravo, L & Corcuera, L. 2012. Leaf seasonal accumulation of a 47-kDa dehydrin and changes in its crioprotectora en *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Blume. *Gayana Bot*, 69(1):1-8.
- Gay, A & Hurd, P. 1975. The influence of light on stomatal density in the tomato. *New Phytol*, 75: 37-46.
- Giordano, C.; Guevara, A.; Boccalandro, H.; Sartor, C & Villagra, P. 2011. Water status, drought responses, and growth of *Prosopis flexuosa* tree with different access to the water table in a warm South American desert. *Plan Ecol*, 212: 1123-1134.
- Hetherington, M & Woodward, F. 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* 424, 901-980.
- Heusser, C.; Heusser, L. and Lowell, T. 1999. Paleoecology of the southern Chilean lake district-isla grande de Chiloe during middle-late Llanquihue glaciation and deglaciation. *Geografiska Annaler Series a-Physical Geography*, 81(2): 231-284.

- Hewitt, G. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58: 247-276.
- Hewitt, G. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *The Royal Society*, 359: 183-195
- Hijmans, R.; Cameron, S.; Parra, J.; Jones P and Jarvis, A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25: 1965-1978.
- Hovenden, M & Brodribb, T. 2000. Altitude of origin influences stomatal conductance and therefore maximum assimilation rate in Southern Beech, *Nothofagus cunninghamii*. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27(5): 451– 456.
- Hollin, J & Schilling, D. 1981. Late Wisconsin-Wichselian mountain glaciers and small ice caps. In: “The Last Great Ice Sheets”, Denton J.H. & T.J. Hughes (Eds), 179-206. Wiley, New York.
- Johansen R. 1940. *Plant microtechnique*. New York, USA. McGraw-Hill. 523 .
- Lake, J.; Quick, W.; Beerling, D & Woodward, F. 2001. Signals from mature to new leaves. *Nature*, 411: 154–155.
- Larcher W. 2000. Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants. *Plant Biosystems*, 134: 279–295.
- Lincoln, J.; Boxshall, G & Clark, P. 2009. *Adictionary of ecology, evolution and systematics*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 2^{da} Edicion, 470.
- Limin, Y.; Mei, H.; Guangsheng, Z & Jiandong, L. 2007. The changes in water-use efficiency and stoma density of *Leymus chinese* along Northeast China Transect. *Acta Ecologica Sinica*, 27: 16-23.

- Marchelli, P.; Gallo, L.; Scholz, F. and Ziegenhagen, B. 1998. Chloroplast DNA markers reveal a geographical divide across Argentinean southern beech *Nothofagus nervosa* (phil.) dim. Et mil. Distribution area. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 642-646.
- Mathiasen, P & Premoli, A. 2010. Out in the cold: genetic variation of *Nothofagus pumilio* (Nothofagaceae) provides evidence for latitudinally distinct evolutionary histories in austral South America. *Molecular Ecology*, 9(2): 371-385.
- Markgraf, V. 1991. Younger Dryas in southern South America. *Boreas* 20, 63-69.
- Meza-Basso, L.; Guarda, P.; Rios, D. and Alberdi, M. 1986. Changes in free aminoacid content and frost resistance in *Nothofagus dombeyi* leaves. *Phytochemistry*, 25: 1843-1846.
- Peñuelas, J & Matamala, R. 1990. Changes in N and S Leaf Content, Stomatal Density and Specific Leaf Area of 14 Plant Species during the Last Three Centuries of CO₂ Increase. *Journal of experimental botany*. 41(9): 1119-1124.
- Poblete, V.; Campos, V.; Gonzalez, L & Montegro, G. 1991. Anatomical Leaf adaptations in vascular plants of a salt marsh in Atacama Desert (Chile). *Revista Chilena de Historia Natural*, 64: 65-75
- Premoli, A. 1998. Isozyme Polymorphisms Provide Evidence of Clinal Variation With Elevation in *Nothofagus pumilio*. *Journal of Heredity*, 218-226.
- Premoli, A.; Kitzberger, T. and Veblen, T. 2000. Isozyme variation and recent biogeographical history of the long-lived conifer *fitzroya cupressoides*. *Journal of Biogeography*, 27: 251-260.

- Premoli, A.; Souto, C.; Rovere.; Allnut, T and Newton A. 2002. Patterns of isozyme variation as indicators of biogeographic history in *Pilgerodendron uviferum* (D. Don) Florín. *Diversity and Distributions*, 57-66.
- Premoli, A.; Vergara, R.; Souto, C.; Lara, A & Newton, C. 2003. Lowland valleys shelter the ancient conifer *Fitzroya cupressoides* in the central depression of southern Chile. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 623-631.
- Premoli, A. & Brewer, C. Environmental v. Genetically driven variation in ecophysiological traits of *Nothofagus pumilio* from contrasting elevations. 2007. *Australian Journal of Botany*. 55, 585–591.
- R Development Core Team (2010) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ramírez-Valiente, J.; Lorenzo, Z.; Soto, A.; Valladares, F.; Gil, L & Aranda, I. 2009a. Elucidating the role of genetic drift and natural selection in cork oak differentiation regarding drought tolerance, 18: 3803– 3815
- Ramírez-Valiente, J.; Sanchez-Gomez, D.; Aranda, I & Valladares, F. 2010. Phenotypic plasticity and local adaptation in leaf ecophysiological traits of 13 contrasting cork oak populations under different water availabilities. *Tree Physiology*, 30(5): 618-627.
- Reyes-Díaz, M., Alberdi, M., Piper, F., Bravo, L.A., Corchera, L.J. 2005. Low temperature responses of *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Blume and *Nothofagus nitida* (Phil.) Krasser, two evergreen species from South Central Chile. *Tree Physiology*, 389-1398.

- Sérsic, A.; Cosacov, A.; Coccuchi, A.; Johnson, L.; Pozner, R.; Avila, L.; Sites, J & Morando, M. 2011. Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103(2): 475–494.
- Villagrán, C. 1991. History of the temperate forests of southern Chile during the late-glacial and Holocene. *Revista Chilena de Historia Natural*, 447-460
- Villagrán, C. & Hinojosa, L. 2005. Esquema biogeográfico de Chile. Regionalización biogeográfica en iberoamérica y tópicos afines: Primeras jornadas biogeográficas de la red iberoamericana de biogeografía y entomología sistemática (ed. by J. Llorente and J.J. Morrone), Las Prensas de Ciencias, UNAM, Mexico, D.F, 551-557.
- Vitousek, P.; Field, C & Matson, P. 1990. Variation in foliar $\delta^{13}\text{C}$ in Hawaiian *Metrosideros polymorpha*: a case of internal resistance?. *Oecologia*, 84(3): 362-370.
- Violle, C.; Navas, M.; Vile, D.; Kazakou, E.; Fortunel, C.; Humme, I & Garnier, E. 2007. Let the concept of trait be functional. *Oikos*, 116(5): 882-892.
- Woodward, F. 1987. Stomatal numbers are sensitive to increases in CO_2 from pre-industrial levels. *Nature*: 327: 617-618.
- Woodward, F & Bazzaz, F. 1988. The responses of stomatal density to CO_2 partial pressure. *Journal of experimental botany*, 39(12): 1771-1781.
- Woodward, F & Kelly, C. 1995. The influence of CO_2 concentration on stomatal density. *New Phytol*, 131: 311–327.
- Zuñiga, G.; Fernandez, J.; Criti.; Alberdi, M & Corcuera, L. 1990. Lipid changes in barley seedlings subjected to water and cold stress. *Phytochemistry*, 3087-3090.