



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

**VARIACIÓN DE LA MORFOLOGÍA FOLIAR Y
ESTOMÁTICA EN EL GÉNERO NOTHOFAGUS:
El caso de *N. dombeyi* y *N. nitida***

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de

BIÓLOGA CON MENCIÓN EN MEDIO AMBIENTE

por

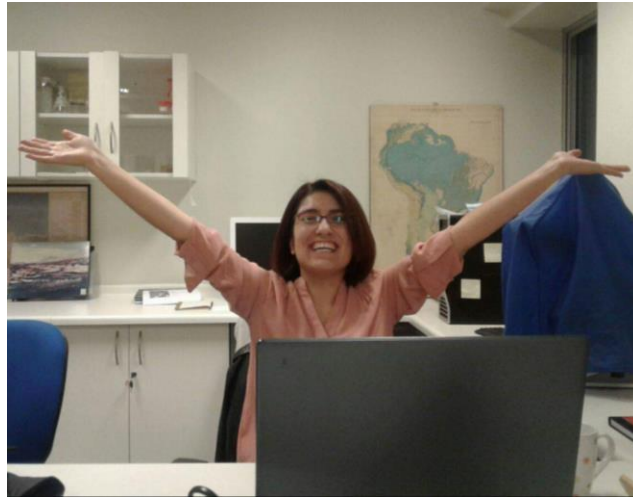
STEPHANY DÍAZ BRANADA

Director del Seminario de Título:

LUIS FELIPE HINOJOSA OPAZO

Diciembre 2018
Santiago – Chile

BIOGRAFÍA



Nací en Talca en 1993, pasé 18 años en la capital de la séptima hasta que el amor por la naturaleza, su conservación y la curiosidad me trajeron a Santiago, a esta Facultad, el año 2011. Mechona moldeada por paros y marchas, marcando un primer año de discontinuos, ramos comprimidos, y de un rico refuerzo a la crítica e interés social. Integrante del laboratorio de Paleoecología desde el 2012, donde me he formado como (futura) científica por ya casi 7 años. Ex integrante de la Asociación de Estudiantes de Biología de Chile, desde el 2013 que ingresé como delegada hasta el 2016 que me retiré como “la presi”. A partir de agosto de ese mismo año, emprendí el gradual desafío de trabajar como profesora en un colegio (en paralelo al desarrollo de este Seminario), labor en la que me mantengo hasta el día de hoy.

DEDICATORIA

A mis padres Silvia y Carlos, por el incondicional apoyo en cada sueño perseguido.

A mi hija Julieta, por el camino que nos espera.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi familia, por el apoyo en cada proyecto que he decidido emprender, por la compañía y contención en momentos de crisis, por las palabras y también por el silencio. Gracias a mis amigos y compañeros: algunos entramos juntos el 2011, otros nos encontramos más adelante en el camino, pero se convirtieron finalmente en mi familia santiaguina. Gracias a ustedes por cada risa, cada reto, cada consejo, por cada junta para “desestresarse”, por cada vez que los necesité y que ahí estuvieron (aunque no los nombre uno a uno, saben quiénes son). Gracias también a esos compañeros de la AEBCH que terminaron siendo amigos, confidentes, compañeros de historias y hasta paños de lágrimas: Edo y Fran, gracias por mantenerse a pesar de las juntas fallidas. Gracias a todos los que me ayudaron con mediciones en alguno de estos años, principalmente a Joaquín Salas que fue mi ayudante y aprendiz.

Gracias a los compañeros (actuales y pasados) del laboratorio: al Pancho Salinas que me ayudó a dar los primeros pasos en esta investigación, a la Cote y a la Naty por su ayuda cada vez que lo necesité para congresos y para este mismo Seminario.

Finalmente, gracias al profe Felipe por tantos años de enseñanza, por creer en mis ideas, por apoyarme incluso con otros proyectos (como la AEBCH), por ayudarme y escucharme en momentos difíciles, y sobre todo por creer en mí e impulsarme a superarme. Además, por supuesto, del amparo económico para el desarrollo de este Seminario gracias a los proyectos Fondecyt 1120215, 1150690, ICM MINECOM P05-002 IEB, PFB 23

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUCCIÓN	4
1.1 Hipótesis	7
1.2 Objetivo General	7
1.3 Objetivos específicos	7
2 MATERIALES Y MÉTODOS	8
2.1 Sitios de estudio y clima	8
2.2 Morfología de estomas	14

2.3 Fisionomía foliar	16
2.4 Análisis estadístico.....	18
3 RESULTADOS	20
3.1 <i>Nothofagus dombeyi</i>	22
3.1.1 Morfología de estomas, lámina y dientes	23
3.1.2 Relación morfología-clima: significancia	25
3.2 <i>Nothofagus nitida</i>	28
3.1.1 Morfología de estomas, lámina y dientes.....	29
3.1.2 Relación morfología-clima: significancia	31
4 DISCUSIÓN	32
4.1 ¿Ambas especies responden morfológicamente a la variación climática? .	32
4.2 Valor predictivo de los caracteres morfológicos.....	33
4.3 Gradiente latitudinal	34
4.4 Déficit hídrico.....	34
4.4 Estrés por frío.	35
4.5 Efecto sinérgico de las temperaturas y precipitaciones.	36
5 CONCLUSIONES	37
6 BIBLIOGRAFÍA.....	38
ANEXO	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 – Localidades de estudio para cada especie. Se indica la cantidad de individuos estudiados para cada sitio y el total de individuos analizados por especie.....	9
Tabla 2 – Variables climáticas consideradas en el estudio: a la izquierda las variables relacionadas a temperatura y a la derecha las relacionadas a precipitaciones. Se incluye el nombre de cada variable y la sigla que se utilizará en las figuras posteriores.....	11
Tabla 3 – Definición de los 20 rasgos morfológicos foliares medidos, descritos en Royer y col., 2005. Las 2 primeras columnas incluyen los rasgos de tamaño y forma de la hoja, las restantes aquellos de forma, tamaño y número de dientes.....	17
Tabla 4 – Variables climáticas seleccionadas en el análisis de correspondencia canónica.....	19
Tabla 5 – Porcentaje de varianza acumulada ¹ e inercia total de los Análisis de correspondencia canónica (CCA) de cada especie, para los dos primeros ejes canónicos.	22
Tabla 7 – Valores de p de Pearson obtenidos para cada variable climática en el test de permutaciones de Monte Carlo. Se destacan en negrita las variables significativas ($p < 0,05$).....	25
Tabla 8 – Valores de p de Pearson obtenidos para cada variable climática en el test de permutaciones de Monte Carlo en el análisis de <i>N. nitida</i> . Se destaca en negrita la variable significativa ($p < 0,05$)	31

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** - Mapa de los sitios de los que provienen las muestras del presente estudio, para ambas especies: a. *Nothofagus dombeyi* y b. *Nothofagus nitida*. La imagen satelital se obtuvo desde Google Earth Pro y la edición se realizó con Photoshop CC 2015 10
- Figura 2** – Gráfico de variación norte-sur de la precipitación estacional (PE), precipitación del mes más seco (PMS), precipitación de la estación más seca (PCS) y precipitación de la estación más cálida (PCC), para el total de localidades estudiadas. 13
- Figura 3** – Detalle de la medición de tamaño de un estoma de *Nothofagus dombeyi*, utilizando el software AxioVision SE64 Rel 4.6. Fotografía tomada con cámara PowerShot A640 utilizando lente 10x del microscopio. 15
- Figura 4** – Imagen obtenida luego de la medición de densidad estomática en una muestra de *N. dombeyi*. El cuadro rojo corresponde a la demarcación del área a medir. Se incluye un zoom a la imagen que muestra los números añadidos (en amarillo) durante la medición con el programa ImageJ. Fotografía tomada en aumento 10x. 16
- Figura 5** – Hojas escaneadas previa a la fijación de un individuo de *Nothofagus dombeyi*, y coloreadas para la posterior medición de los rasgos foliares. Las letras se utilizan para identificar cada muestra. 18
- Figura 6** – Biplot obtenido del análisis de correspondencia canónica (CCA) aplicado a la morfología de *N. dombeyi* y *N. nitida*. El diagrama muestra la relación entre las localidades estudiadas (círculos) y 7 variables climáticas² (flechas). 21
- Figura 7** - Biplot obtenido del análisis de correspondencia canónica (CCA) aplicado a la morfología de *N. dombeyi*. El diagrama muestra la relación entre los 23 rasgos morfológicos¹ (círculos) y 7 variables climáticas² (flechas). Los rasgos morfológicos se

clasificaron en tres grupos, diferenciados por color (rasgos de estomas, lámina o dientes). Cada grupo de rasgos fue encerrado con un círculo punteado del color correspondiente.

.....24

Figura 8 - Diagrama de ordenación de los rasgos morfológicos de *N. dombeyi* obtenido del CCA. Los rasgos morfológicos¹ se clasifica en tres grupos diferenciados por color (rasgos de estomas, de la lámina y dientes). Se indica la relación significativa usando círculos (línea continua si es positiva o discontinua si es negativa) con la sigla de la variable climática² contenida en él (negra si es positiva, gris si es negativa).26

Figura 9 - Biplot obtenido del análisis de correspondencia canónica (CCA) aplicado a la morfología de *N. nitida*. El diagrama muestra la relación entre los 23 rasgos morfológicos¹ (círculos) y 7 variables climáticas² (flechas). Los rasgos morfológicos se clasificaron en tres grupos, diferenciados por color (rasgos de estomas, de la lámina y dientes). Cada grupo fue encerrado con un círculo punteado del color correspondiente.30

LISTA DE ABREVIATURAS

C:	Compacidad
FD:	Diámetro de Feret
IP:	Perímetro sin dientes
IST:	Isotermalidad
LA:	Área de lámina
ML:	Longitud mayor
mL:	Longitud menor
MTA:	Área de dientes promedio
P:	Perímetro de lámina
PA:	Precipitación anual
PCC:	Precipitación de la estación más cálida
PCF:	Precipitación de la estación más fría
PCLI:	Precipitación de la estación más lluviosa
PCS:	Precipitación de la estación más seca
PE:	Estacionalidad de la precipitación
PMLI:	Precipitación del mes más lluvioso
PMS:	Precipitación del mes más seco
PT:	Dientes primarios
RAT:	Rango anual de temperatura
RDP:	Rango diurno promedio
RF:	Razón de Feret

SD:	Densidad estomática
SF:	Factor forma
SL:	Largo de estoma
ST:	Dientes secundarios
SW:	Ancho de estoma
T:	Número de dientes
TA:	Área de dientes
TE	Estacionalidad de la temperatura
TMA:	Temperatura media anual
TMCC:	Temperatura promedio de la estación más cálida
TMCF:	Temperatura promedio de la estación más fría
TMCS:	Temperatura promedio de la estación más seca
TMEH:	Temperatura promedio de la estación más húmeda
TMMC:	Temperatura máxima del mes más cálido
TmMF:	Temperatura mínima del mes más frío

RESUMEN

La fuerte relación entre la fisionomía foliar y el clima ha sido utilizada para desarrollar modelos de reconstrucción paleo-climática. Asimismo, la densidad estomática y el tamaño de estomas responden, en algunas especies, a las variaciones de temperatura y humedad, como resultado de la compensación entre la pérdida de agua y la absorción de CO₂. Sin embargo, el efecto del ambiente en la morfología de estomas es especie-específico, y no ha sido evaluado aún en el género *Nothofagus*.

El presente estudio evalúa la variación de 23 rasgos foliares de *N. dombeyi* y *N. nitida*, considerando 21 sitios distribuidos entre los 35,6°S a los 46,5°S. Según los patrones globales descritos y las notables variaciones en temperatura y precipitación de la transición latitudinal del clima mediterráneo-templado, se predice que individuos de mayor latitud presenten hojas y estomas más grandes, mayor densidad estomática y cantidad de dientes, y hojas de menor circularidad. Para determinar la validez de la predicción, se registró la variación morfológica de lámina y estomas para las dos especies, y se evaluó la relación morfología-clima mediante análisis multivariado.

A excepción de la forma de la hoja en *N. dombeyi*, se encontró una respuesta morfológica inversa a la esperada, y se determinó que cuatro rasgos de la morfología foliar pueden ser usados como indicadores paleo-climáticos en esta especie. Además, se postula el tamaño de estomas como posible indicador paleoclimático, previa evaluación de su señal filogenética. Finalmente, se establecen las bajas temperaturas como principal, pero no único, determinante en el tamaño de hojas y estomas en *N. dombeyi*.

ABSTRACT

The strong leaf physiognomy-climate relationship has been used for the development of past climate reconstruction models. In addition, stomatal size and density respond, in some species, to temperature and moisture variations, as a result of water and CO₂ trade-off. However, the environmental effect on specie-specific stomatal morphology has not been evaluated yet on the genus *Nothofagus*.

The current work evaluates 23 foliar traits variation on *N. dombeyi* and *N. nítida* along 21 sample sites distributed between 35.6°S and 46.5°S. According to global patterns described for the leaf-climate relationship, and the wide variation of temperature and moisture between the Mediterranean-Temperate climate transition, individuals growing at high latitudes should have bigger stomata and leaf sizes, higher stomatal density and tooth number, and have less rounded leaf. To determine the veracity of this prediction, leaf and stomatal morphology were recorded for two species, and the leaf morphology-climate relationship was evaluated with a multivariate analysis.

For *N. dombeyi*, the results showed an inverse leaf morphology-climate relationship (except for leaf shape) and that 4 of the 23 foliar traits evaluated can be used as paleoclimate proxies. Moreover, it is proposed that stomatal size could be used as paleoclimate proxy, with prior evaluation of the phylogenetic signal. Finally, low

temperature is established as the principal driver, but not the only one, for leaf and stomatal sizes on *N. dombeyi*.

1 INTRODUCCIÓN

Los paleobotánicos se han basado en diferentes rasgos de las hojas fósiles para reconstruir condiciones ambientales pasadas (Wolfe y col., 1971; Royer y col., 2005; Hinojosa & Villagrán, 2005; Peppe y col., 2011; Hinojosa y col., 2011; Hinojosa y col., 2016;). Entre ellos, la fisionomía foliar y los rasgos morfológicos de estomas se han utilizado para estimar paleo-climas y concentración de dióxido de carbono (Royer, 2001; Beerling & Royer, 2002).

La aplicación de la fisionomía foliar como indicador paleoclimático se restringió en un comienzo al uso de caracteres discretos, expandiéndose posteriormente al uso de caracteres continuos (Huff y col., 2003). Se ha determinado que el incluir un mayor número de caracteres morfológicos mejora sustancialmente el poder de la predicción (Royer y col., 2005). Así, para dicotiledóneas se han descrito fuertes relaciones entre el clima y la fisionomía foliar: relación positiva entre proporción de especies con hojas de margen entero y temperatura media anual (Bailey & Sinnott, 1916; Hinojosa y col., 2011), mayor circularidad en hojas expuestas a mayor temperatura media anual (Huff y col., 2003; Royer y col., 2005; Peppe y col., 2011), mayor número y tamaño de dientes en comunidades de climas fríos, así como hojas más grandes y dientes más pequeños para climas húmedos (Royer & Wilf, 2006; Peppe y col., 2011).

Por otro lado, la compensación existente entre captación de dióxido de carbono, y por ende en la tasa fotosintética, y pérdida de agua por evapotranspiración (Damour y col., 2010) genera variaciones morfológicas en estomas de individuos expuestos a diferentes condiciones ambientales. Esto debido a diversos factores que influyen en la apertura estomática y desarrollo de los estomas, como el estado hídrico del suelo (Christmann y col., 2007). Además, se ha descrito para algunas especies que la densidad estomática (número de estomas por mm^2) es menor en individuos que crecen en climas más cálidos y secos, lo que disminuiría la pérdida de agua a través de una disminución de la conductancia estomática (Dunlap & Stettler, 2001; Pearce y col., 2005; Yang y col., 2007; Figueroa y col., 2010), y que en condiciones de mayor humedad se encuentran estomas más largos y mayor densidad estomática (Bakker, 1991). Sin embargo, el grado de influencia del ambiente en la iniciación y desarrollo de estomas es especie-específico (Zhang y col., 2012), por lo que, si el interés es usar estos rasgos como paleo-indicadores, es necesario determinar previamente si existe o no una respuesta asociada a diferentes condiciones ambientales.

De esta forma, si el clima influye tanto en la morfología de estomas como en la fisionomía foliar de una especie, dicha especie podría ser utilizada para construir modelos predictivos de paleo-climas basado en un mayor número de caracteres.

En el presente estudio el interés se centra en el género *Nothofagus*, componente del elemento Australasiano-Austral/Antártico de gran importancia fitogeográfica (Donoso, 1987; Ramirez, 1987; Villagran & Hinojosa, 1997), evaluando el caso de dos especies siempreverdes presentes en Chile: *Nothofagus dombeyi* (Coigüe) y *Nothofagus nitida* (Coigüe de Chiloé), cuya distribución va de los 34.6°S y los 47.0°S, y de los 40°S a los 49.2°S respectivamente, rango latitudinal que incluye la transición mediterráneo-

templada (Luebert & Pliscoff, 2006). Estas especies se diferencian en que el Coigüe regenera en lugares térmicamente más desfavorables, es sombra-intolerante y pionera en hábitats de montaña, mientras que *N. nitida* es semi-sombra-tolerante y regenera en condiciones de humedad constante y temperaturas intermedias (Alberdi, 1987; Reyes-Díaz y col., 2009).

Ambas especies abarcan un amplio rango de distribución latitudinal, por lo que al estar expuestas a diferentes condiciones ambientales podrían presentar diferencias morfológicas. Sin embargo, la relación morfología-clima incluyendo caracteres de estomas no ha sido evaluada aún para estas especies. Entonces cabe preguntarse, ¿existe en *N. dombeyi* y *N. nitida* una respuesta morfológica asociada a las diferentes condiciones climáticas? y, en caso de existir, ¿responden según los patrones encontrados en otros linajes? Según lo descrito para otros linajes, individuos expuestos a mayores niveles de humedad presentan hojas y estomas más grandes, mayor densidad estomática y dientes más pequeños, mientras que aquellos expuestos a menores temperaturas presentan mayor densidad estomática y número de dientes, así como hojas menos circulares. Considerando que en Chile las precipitaciones aumentan con la latitud, mientras que la temperatura disminuye, entonces se esperaría encontrar este patrón en la variación de la morfología foliar y estomática de los individuos estudiados.

1.1 Hipótesis

Dada las notables variaciones en temperaturas y precipitaciones de la transición latitudinal del clima mediterráneo-templado; y a los patrones globales en la relación fisionomía foliar y gradientes climáticos, entonces se espera que en especies de amplio rango de distribución en Chile, individuos de mayor latitud tengan hojas y estomas más grandes, mayor cantidad de estomas y dientes, y hojas menos circulares.

1.2 Objetivo General

Evaluar la respuesta morfológica (rasgos foliares y morfología de estomas) asociada a la variación climática en dos especies de amplia distribución en Chile: *Nothofagus dombeyi* y *Nothofagus nitida*

1.3 Objetivos específicos

- 1° Registrar la variación morfológica de *N. dombeyi* y *N. nitida* en 21 sitios en un gradiente latitudinal de entre 35.6°S y 46.5°S.
- 2° Medir 20 rasgos fisionómicos propuestos por Royer y col. (2005) para ambas especies.
- 3° Medir el tamaño de estomas (largo y ancho) y la densidad estomática para ambas especies.
- 4° Analizar la relación entre morfología y clima utilizando análisis multivariado.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Sitios de estudio y clima

Se utilizan 49 individuos de herbarios provenientes de 21 localidades a lo largo de Chile, comprendidos entre los 35.6 - 46.5 °S y los 71.0 - 74.1 °O (Tabla 1). Esto incluye 27 individuos de *Nothofagus dombeyi* procedentes de 16 localidades, y 22 individuos de *Nothofagus nítida* provenientes de 11 localidades. Cinco de las localidades analizadas son compartidas para ambas especies.

Tabla 1 – Localidades de estudio para cada especie. Se indica la cantidad de individuos estudiados para cada sitio y el total de individuos analizados por especie.

Localidad	N. <i>nitida</i>	N. <i>dombeyi</i>	Localidad	N. <i>nitida</i>	N. <i>dombeyi</i>
Alerce Andino (41,6°S)	3	-	La Picada (40,0°S)	-	1
Alto Bío-Bío (37,9°S)	-	1	Los Ruiles (35,9)	-	2
Chinchel (41,6°S)	3	-	Nahuelbuta norte (37,7°S)	-	4
Cordillera Pelada (40,2°S)	3	3	Nahuelbuta sur (37,8°S)	-	2
Coyhaique (46,5°S)	1	1	Puerto Aysén (45,6°S)	1	-
Cucao (42,5°S)	4	-	PN Villarrica (39,5°S)	-	1
Detico (42,9°S)	-	1	Puerto Raúl Marín (43,8°S)	1	1
Hornopiren norte (41,6°S)	1	1	Puyehue (40,7°S)	-	1
Hornopiren sur (42,1°S)	1	1	Tantauco (43,0°S)	1	-
Hueicolla (40,1°S)	3	2	Vilches (35,6 °S)	-	1
Induena, Cardenas y Puerto Alto (41,6°S)	-	4			

El gradiente latitudinal estudiado para ambas especies contempla hasta la Región de Aysén con la localidad de Coyhaique (Figura 1): *Nothofagus dombeyi* abarca desde la VII Región del Maule, con la localidad de Vilches (Figura 1-a) y *Nothofagus nitida* desde la XIV Región de Los Ríos, con los sitios Hueicolla y Cordillera Pelada (Figura 1-b). En el caso de Nahuelbuta y Hornopirén se contemplaron 2 sitios para cada uno (norte y sur).

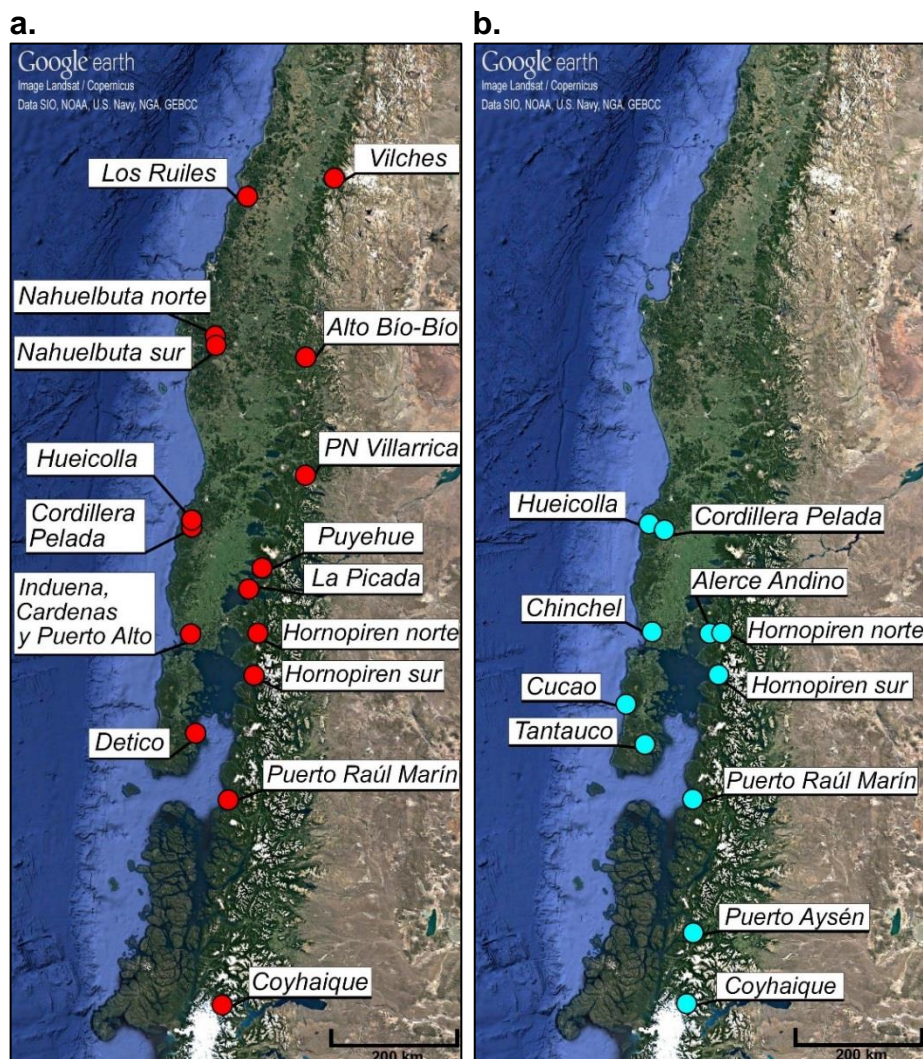


Figura 1 - Mapa de los sitios de los que provienen las muestras del presente estudio, para ambas especies: a. *Nothofagus dombeyi* y b. *Nothofagus nitida*. La imagen satelital se obtuvo desde Google Earth Pro y la edición se realizó con Photoshop CC 2015

Para cada localidad estudiada se extrajeron las 19 variables climáticas de WorldClim (Tabla 2) que incluye variables relacionadas a la temperatura y precipitación. Estas variables representan tanto las condiciones promedio como el comportamiento en períodos extremos y variaciones (anuales y diarias) (Fick & Hijmans, 2017).

Tabla 2 – Variables climáticas consideradas en el estudio: a la izquierda las variables relacionadas a temperatura y a la derecha las relacionadas a precipitaciones. Se incluye el nombre de cada variable y la sigla que se utilizará en las figuras posteriores.

Variable climática	Sigla	Variable climática	Sigla
Temperatura media anual	TMA	Precipitación anual	PA
Rango diurno promedio (oscilación térmica diaria)	RDP	Precipitación del mes más lluvioso	PMLI
Isotermalidad (RDP/RAT)	IST		
Estacionalidad de la temperatura	TE	Precipitación del mes más seco	PMS
Temperatura máxima del mes más cálido	TMMC	Estacionalidad de la precipitación	PE
Temperatura mínima del mes más frío	TmMF	Precipitación de la estación más lluviosa	PCLI
Rango anual de temperatura	RAT		
Temperatura promedio de la estación más húmeda	TMEH	Precipitación de la estación más seca	PCS
Temperatura promedio de la estación más seca	TMCS	Precipitación de la estación más cálida	PCC
Temperatura promedio de la estación más cálida	TMCC	Precipitación de la estación más fría	PCF
Temperatura promedio de la estación más fría	TMCF		

El gradiente latitudinal abarcado incluye la transición desde el clima mediterráneo hasta el clima templado en el extremo sur de Chile. El primero se caracteriza por una fuerte estacionalidad, con precipitaciones invernales y sequía estival de al menos dos meses consecutivos, en cambio el segundo no presenta este período estival con déficit hídrico.

Mientras, en la zona de transición Mediterránea-Templada se presentarían condiciones intermedias (Villagran & Hinojosa, 1997).

Para las localidades contempladas en este estudio, existe una variación gradual norte-sur en 4 de las 19 variables climáticas consideradas: precipitación estacional (PE), precipitación del mes más seco (PMS), precipitación de la estación más seca (PCS) y precipitación de la estación más cálida (PCC) (Figura 2).

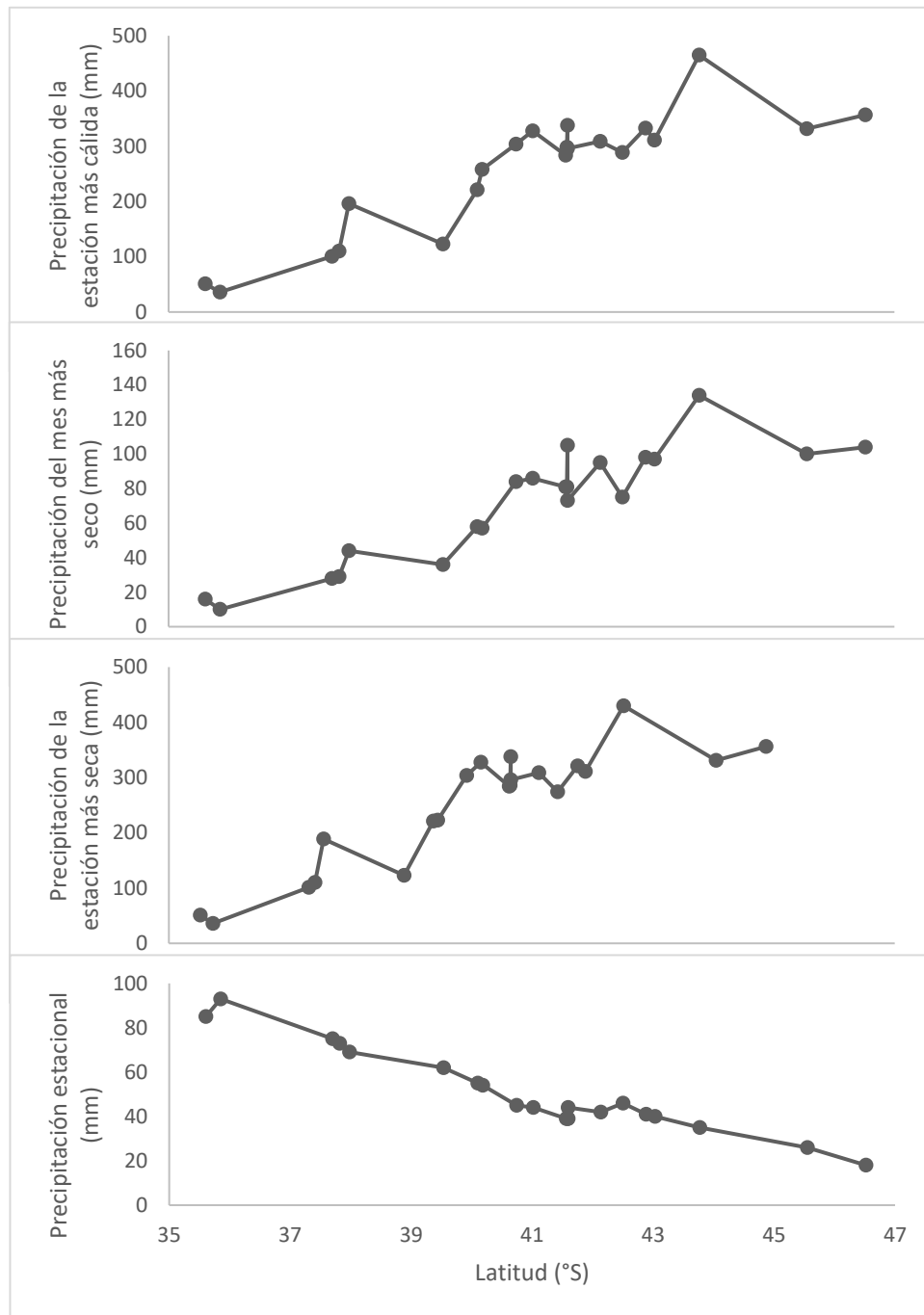


Figura 2 – Gráfico de variación norte-sur de la precipitación estacional (PE), precipitación del mes más seco (PMS), precipitación de la estación más seca (PCS) y precipitación de la estación más cálida (PCC), para el total de localidades estudiadas.

2.2 Morfología de estomas

Se miden 3 rasgos morfológicos en 5 hojas de cada individuo: densidad estomática (n° de estomas por mm²), largo y ancho de estoma. En el caso de la densidad estomática se miden 10 réplicas por muestra, y 20 estomas por muestra para el tamaño.

En la preparación de las muestras se extraen los dientes de las hojas con un bisturí, para facilitar el posterior desprendimiento de las cutículas, y se realiza el siguiente procedimiento:

- 1) Aclarado con hipoclorito sódico por 3 a 4 días, hasta que las cutículas se desprendan por la desintegración del mesófilo.
- 2) Lavado con agua destilada y separación de ambas cutículas con ayuda de cinceles y lupa.
- 3) Tinción de ambas cutículas con azul de metileno. Las muestras se dejan reposar en azul de metileno y agua destilada por 1 a 3 horas, dependiendo de la muestra.
- 4) Montaje de la muestra utilizando jalea/timol como adhesivo.
- 5) Sellado de bordes del cubre-objeto con esmalte transparente.

Luego, se fotografían 10 secciones de cada muestra preparada utilizando un microscopio Zeiss Axio Lab.A1 con cámara asociada, evitando zonas cercanas al borde y aquellas donde se ubicaban las venas. Las cámaras usadas fueron: PowerShot A640 (software RemoteCapture) y AxioCam ERc 5s (software AxioVision SE64 Rel 4.6).

Para medir tamaño se utiliza el software AxioVision SE64 Rel 4.6. El largo y ancho de estomas se mide desde el inicio al término de las células oclusivas (Figura 3).

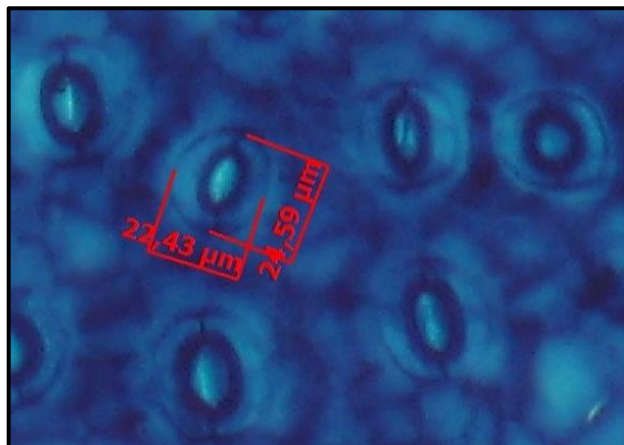


Figura 3 – Detalle de la medición de tamaño de un estoma de *Nothofagus dombeyi*, utilizando el software AxioVision SE64 Rel 4.6. Fotografía tomada con cámara PowerShot A640 utilizando lente 10x del microscopio.

Para la densidad estomática se genera una imagen con el área de 1 mm² enmarcada, utilizando el mismo software. Luego, se contabilizan los estomas del área enmarcada usando la herramienta multi-point del programa ImageJ: se selecciona cada estoma y se extrae el número total de selecciones (Figura 4).

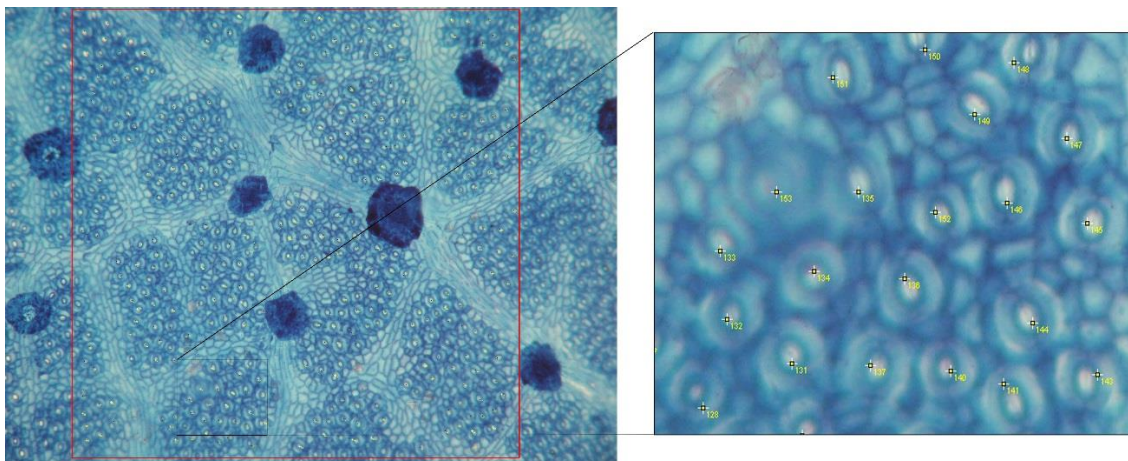


Figura 4 – Imagen obtenida luego de la medición de densidad estomática en una muestra de *N. dombeyi*. El cuadro rojo corresponde a la demarcación del área a medir. Se incluye un zoom a la imagen que muestra los números añadidos (en amarillo) durante la medición con el programa ImageJ. Fotografía tomada en aumento 10x.

2.3 Fisionomía foliar

Se miden 20 rasgos foliares descritos por Royer y col. (2005) a cada individuo (Tabla 3), usando el programa SigmaScan Pro 5.

Tabla 3 – Definición de los 20 rasgos morfológicos foliares medidos, descritos en Royer y col., 2005. Las 2 primeras columnas incluyen los rasgos de tamaño y forma de la hoja, las restantes aquellos de forma, tamaño y número de dientes.

Rasgo	Descripción	Rasgo	Descripción
Área (LA)	área de lámina	Área dientes (TA)	área de dientes
Perímetro (P)	perímetro de lámina	TA / LA	área de dientes/área de lámina
Perímetro interno (IP)	perímetro sin dientes	TA / P	área de dientes/perímetro de lámina
P/IP	perímetro/perímetro interno	TA / IP	área de dientes/perímetro interno de lámina
Compacidad (C)	$(4\pi \times \text{área lámina}) / \text{perímetro}^2$	Dientes primarios (PT)	n° de dientes primarios
Factor forma (SF)	$\text{perímetro}^2 / \text{área lámina}$	Dientes secundarios (ST)	n° de dientes secundarios
Longitud mayor (ML)	Distancia eje mayor	N° de dientes (T)	n° de dientes totales
Longitud menor (mL)	Distancia eje menor	Promedio área de dientes (MTA)	Área de dientes/dientes primarios
Diámetro de Feret (FD)	Diámetro de un círculo de área equivalente	T/P	n° de dientes/perímetro de lámina
Razón de Feret (RF)	Diámetro de Feret/Eje mayor	T/IP	n° de dientes/perímetro interno de lámina

Para ello, se edita con Photoshop una fotografía de los individuos, aislando y coloreando 5 hojas. Para algunas mediciones se utilizaron fotografías ya existentes de los herbarios, otras fueron fotografiadas o escaneadas previo a la preparación y montaje de muestras descrito en el punto anterior (Figura 5).

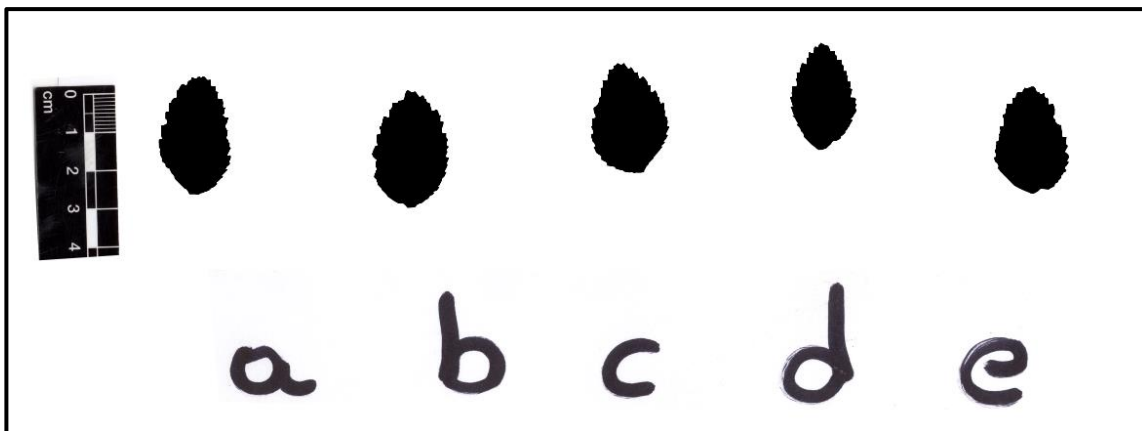


Figura 5 – Hojas escaneadas previa a la fijación de un individuo de *Nothofagus dombeyi*, y coloreadas para la posterior medición de los rasgos foliares. Las letras se utilizan para identificar cada muestra.

2.4 Análisis estadístico

Para ambas especies, se realiza un análisis de correspondencia canónica (CCA) entre todas las variables morfológicas y las 19 variables climáticas extraídas para cada sitio, utilizando el software Canoco 4,5 (Ter Braak, 1986; Ter Braak & Prentice, 2004; Lepš & Šmilauer, 2003). El análisis se hace centrado en las distancias entre especies y aplicando el test de permutaciones de Monte Carlo para la selección de variables ambientales, reduciéndolas a 7 variables (Tabla 4)

Tabla 4 – Variables climáticas seleccionadas en el análisis de correspondencia canónica.

Temperaturas	Precipitaciones
TMA, TMEH, TMCS, IST	PA, PMS, PMLI

Se realizaron las siguientes transformaciones para los datos morfológicos (1) y variables ambientales (2):

$$x = \frac{1}{n} \quad (1)$$

$$x = \frac{1}{n+1} \quad (2)$$

Donde x corresponde al nuevo valor y n al dato original.

3 RESULTADOS

El análisis de correspondencia canónica muestra una respuesta similar para ambas especies (Figura 6). Particularmente, los individuos de Hornopiren Sur presentan el mismo *score*. En el análisis, el 90% de la variabilidad de los datos es explicada por el primer eje canónico, que corresponde a la combinación lineal de temperaturas, principalmente temperatura media anual, temperatura media de la estación más seca, e isothermalidad; mientras el 7,8% de la variabilidad es explicada por las variables climáticas restantes.

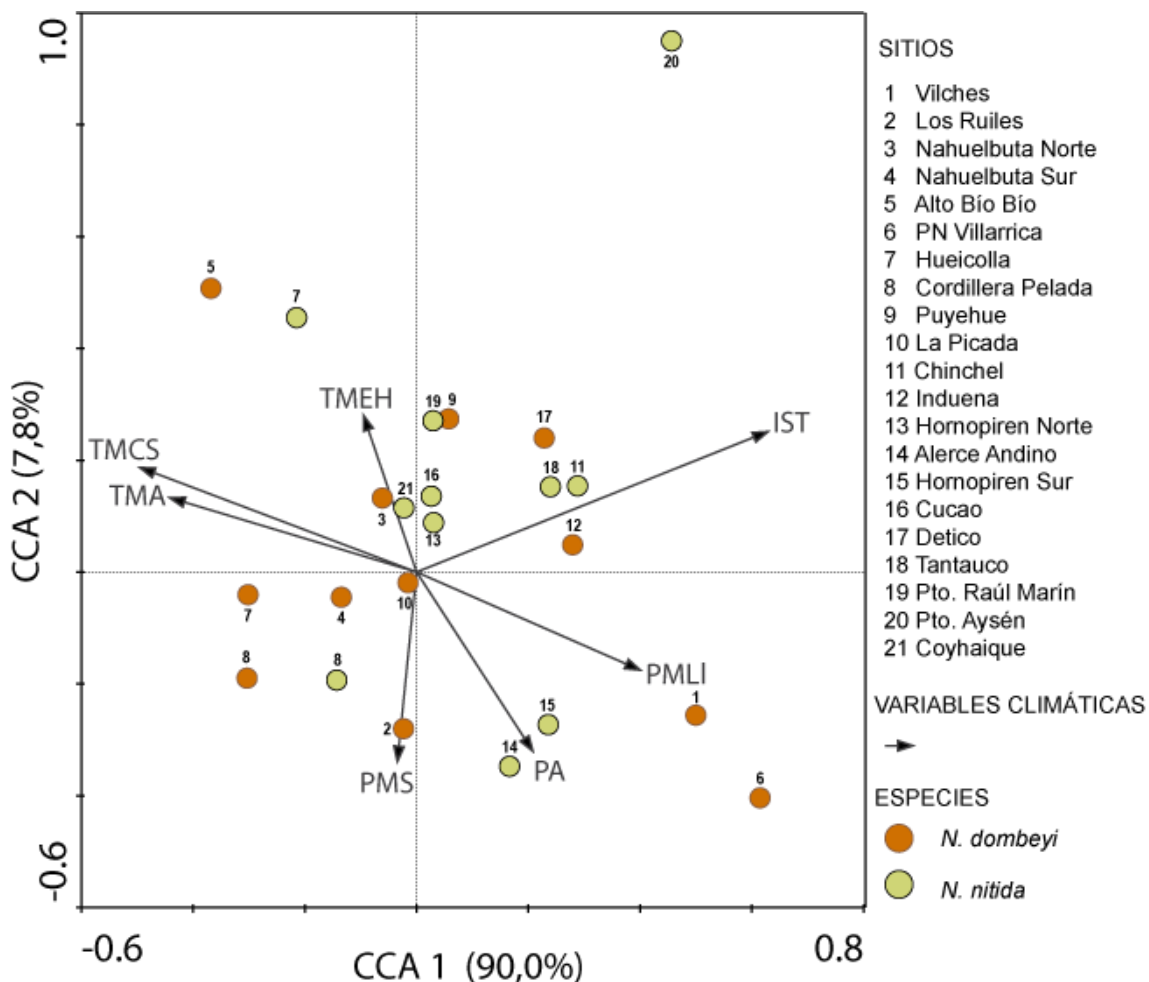


Figura 6 – Biplot obtenido del análisis de correspondencia canónica (CCA) aplicado a la morfología de *N. dombeyi* y *N. nitida*. El diagrama muestra la relación entre las localidades estudiadas (círculos) y 7 variables climáticas² (flechas).

¹ Nomenclatura de variables climáticas: temperatura media anual (TMA), temperatura promedio de la estación más seca (TMCS) y más húmeda (TMEH), isoterma (IST), precipitación anual (PA), del mes más lluvioso (PMLI), y más seco (PMS).

De todas las variables climáticas consideradas, sólo la isoterma no presenta una relación estadísticamente significativa con las variables morfológicas (t-value no se encuentra entre -2 y 2)

Según lo obtenido en el análisis de correspondencia canónica para cada especie, la relación morfología-clima en *N. dombeyi* presenta mayor confiabilidad, por lo que las condiciones climáticas a las que se ven expuestos los individuos de *N. dombeyi* explican de mejor manera su morfología (Tabla 5).

Tabla 5 – Porcentaje de varianza acumulada¹ e inercia total de los Análisis de correspondencia canónica (CCA) de cada especie, para los dos primeros ejes canónicos.

Eje	<i>N. dombeyi</i>		<i>N. nitida</i>	
	1	2	1	2
Datos morfológicos ¹	41,1	46,9	23,1	28,2
Relación morfología-clima ¹	84,5	96,5	73,8	89,9
Inercia total	0,042		0,014	

En ambos casos, el primer eje canónico es el que captura la mayor cantidad de variabilidad.

A continuación se expone lo obtenido para cada una de las especies.

3.1 *Nothofagus dombeyi*

En el análisis de correspondencia canónico (CCA) de *Nothofagus dombeyi* las variables climáticas que tienen mayor correlación con el primer eje canónico son: temperatura máxima de la estación más seca (TMCS), temperatura media anual (TMA), isotermalidad (IST) y precipitación del mes más lluvioso (PMLI). Por otro lado, las variables climáticas

que tienen mayor correlación con el segundo eje canónico son: precipitación del mes más seco (PMS), precipitación del mes más lluvioso (PMLI) y precipitación anual (PA). Por tanto, mayoritariamente las variables de temperatura se correlacionan mejor con el primer eje, mientras que las precipitaciones se relacionan con el segundo eje, y considerando que el primer eje canónico captura el 84,5% de la variabilidad de los datos, entonces la distribución de estos en el diagrama de ordenación estaría determinada en mayor grado por las temperaturas (Figuras 7 y 8).

3.1.1 Morfología de estomas, lámina y dientes

Al analizar la distribución de los rasgos morfológicos en el diagrama de ordenación (Figura 7) se aprecia una clara diferenciación entre los rasgos foliares relacionados con tamaño y forma de la lámina de aquellos relacionados con los dientes.

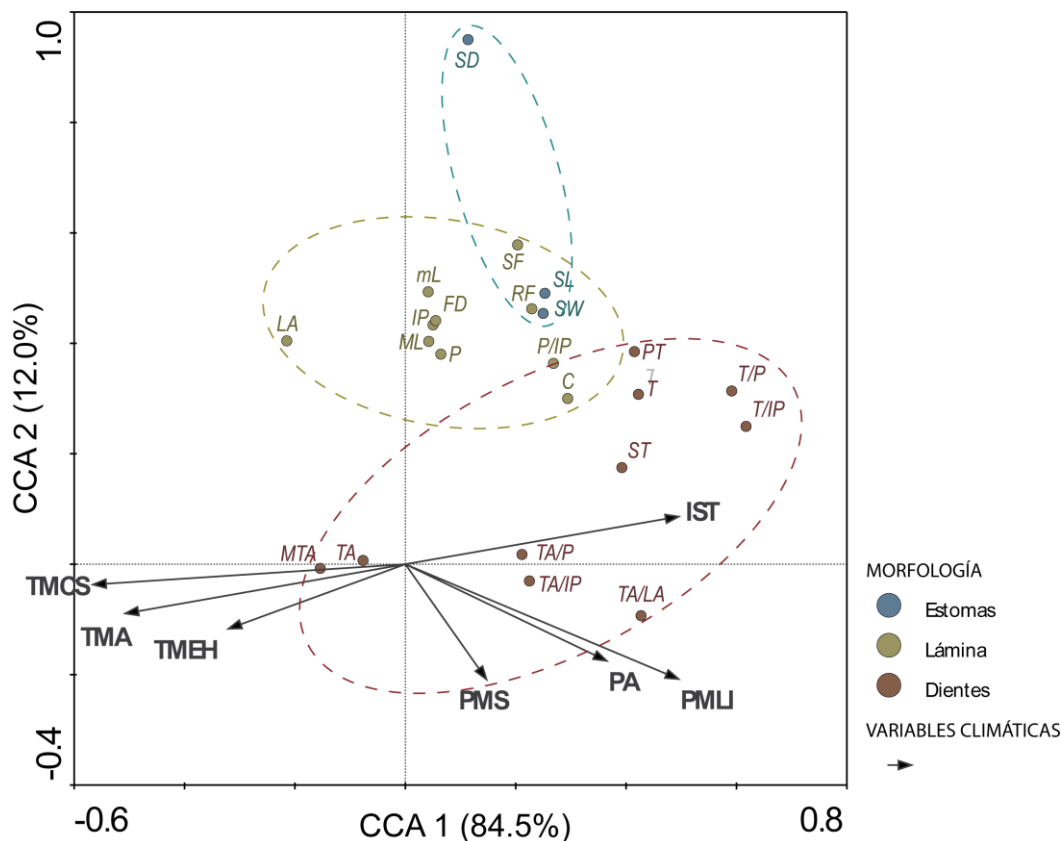


Figura 7 - Biplot obtenido del análisis de correspondencia canónica (CCA) aplicado a la morfología de *N. dombeyi*. El diagrama muestra la relación entre los 23 rasgos morfológicos¹ (círculos) y 7 variables climáticas² (flechas). Los rasgos morfológicos se clasificaron en tres grupos, diferenciados por color (rasgos de estomas, lámina o dientes). Cada grupo de rasgos fue encerrado con un círculo punteado del color correspondiente.

¹ Nomenclatura de rasgos morfológicos: largo de estoma (SL), ancho de estoma (SW), densidad estomática (SD), área de lámina (LA), perímetro (P), longitud eje mayor (ML) y menor (mL), perímetro interno (IP), factor forma (SF), diámetro de Feret (FD), razón de Feret (RF), compacidad (C), n° dientes totales (T), primarios (PT) y secundarios (ST), área de dientes (TA) y área de dientes promedio (MTA).

² Nomenclatura de variables climáticas: temperatura media anual (TMA), temperatura promedio de la estación más húmeda (TMEH) y más seca (TMCS), isothermalidad (IST), precipitación anual (PA), del mes más seco (PMS) y más lluvioso (PMLI).

Los rasgos morfológicos de la lámina se ubican en la parte superior del diagrama, mientras los de dientes se encuentran en la parte inferior. Los rasgos morfológicos

asociados al tamaño de estomas están contenidos en el primer grupo mencionado, pero la densidad estomática no, aunque está más relacionada a este que a la morfología de dientes. Esto indica que los rasgos estomáticos, principalmente el tamaño de estomas, responden de forma similar a la morfología de la lámina.

3.1.2 Relación morfología-clima: significancia

El test de permutaciones de Monte Carlo determina que la temperatura promedio de la estación más seca (TMCS) y la temperatura media anual (TMA) presentan relaciones lineales significativas con la morfología de *N. dombeyi* (Tabla 7).

Tabla 6 – Valores de p de Pearson obtenidos para cada variable climática en el test de permutaciones de Monte Carlo. Se destacan en negrita las variables significativas ($p < 0,05$)

	TMA	TMCS	TMEH	IST	PA	PMS	PMLI
<i>p-value</i>	0,02	0,04	0,47	0,31	0,24	0,10	0,13

Al evaluar la relación entre variables climáticas y cada uno de los rasgos morfológicos (Figura 8), se encontraron relaciones significativas, donde el t-value va de -2 a 2, entre la morfología de la lámina, tamaño de dientes y de estomas con 6 de las 7 variables climáticas analizadas: positivas para la temperatura media de la estación más húmeda (TMEH), de la estación más cálida (TMCS) y precipitación anual (PA), y negativa para la temperatura media anual (TMA) y precipitación del mes más seco (PMS) y más lluvioso

(PMLI). La isothermalidad no presentó relación significativa con la morfología de esta especie.

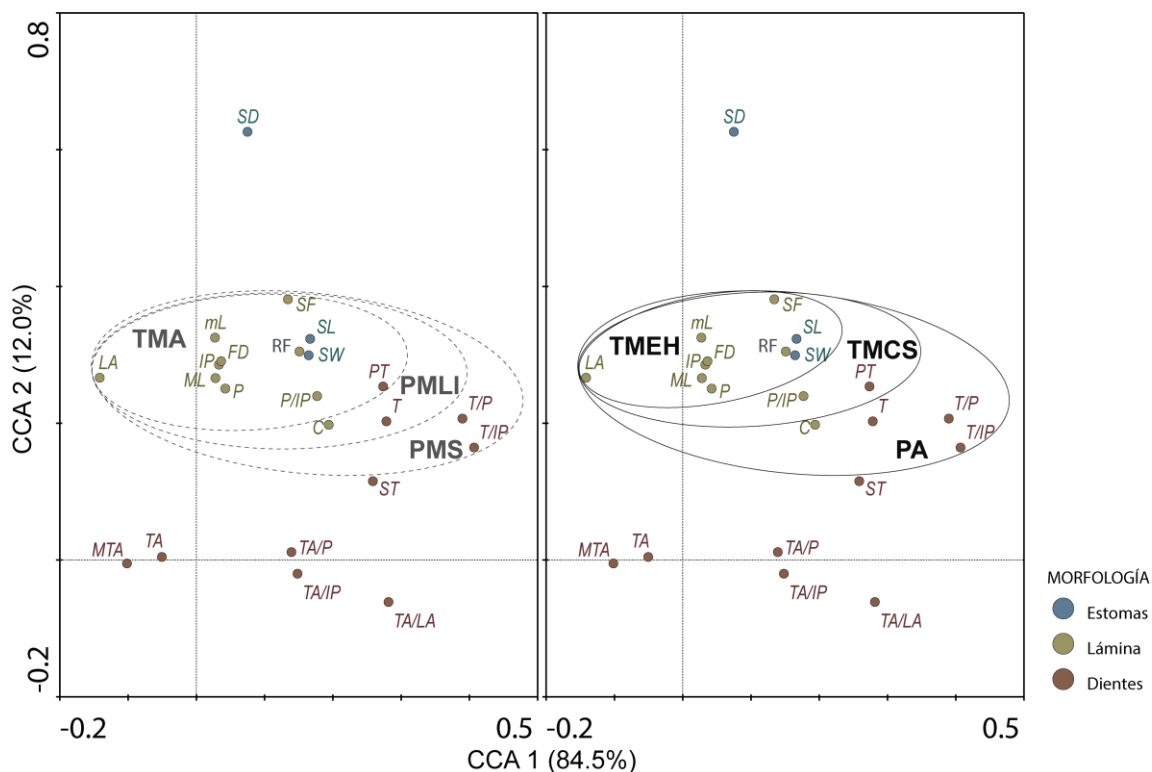


Figura 8 - Diagrama de ordenación de los rasgos morfológicos de *N. dombeyi* obtenido del CCA. Los rasgos morfológicos¹ se clasifican en tres grupos diferenciados por color (rasgos de estomas, de la lámina y dientes). Se indica la relación significativa usando círculos (línea continua si es positiva o discontinua si es negativa) con la sigla de la variable climática² contenida en él (negra si es positiva, gris si es negativa).

¹ Nomenclatura de rasgos morfológicos: largo de estoma (SL), ancho de estoma (SW), densidad estomática (SD), área de lámina (LA), perímetro (P), longitud eje mayor (ML) y menor (mL), perímetro interno (IP), factor forma (SF), diámetro de Feret (FD), razón de Feret (RF), compacidad (C), n° dientes totales (T), primarios (PT) y secundarios (ST), área de dientes (TA) y área de dientes promedio (MTA).

² Nomenclatura de variables climáticas: temperatura media anual (TMA), temperatura promedio de la estación más húmeda (TMEH) y más seca (TMCS), isothermalidad (IST), precipitación anual (PA), del mes más seco (PMS) y más lluvioso (PMLI).

La precipitación anual y la precipitación del mes más seco (PA y PMS) son las variables climáticas que se relacionan significativamente con la mayor cantidad de rasgos

morfológicos en este análisis, presentando relaciones con las mismas variables, pero en sentido inverso. A continuación, se detallan las relaciones significativas encontradas:

- i) La temperatura media anual (TMA) se relaciona negativamente con el tamaño de estomas y con casi todos los rasgos morfológicos de la lámina, a excepción de la compacidad. Además, presenta una relación negativa con la cantidad de dientes primarios. Según estas relaciones, a mayor TMA se tendrían hojas más pequeñas y menos redondas, con estomas de menor tamaño y menor cantidad de dientes primarios.
- ii) La temperatura promedio de la estación más seca (TMCS) se presenta una relación positiva con los mismos rasgos que la temperatura media anual. Así, a medida que aumenta la temperatura de la estación más seca, se tienen hojas más grandes, más redondas, con estomas de mayor tamaño y mayor cantidad de dientes primarios.
- iii) La temperatura promedio de la estación más húmeda (TMEH) presenta las mismas relaciones significativas que la TMCS, exceptuando el cociente entre perímetro y perímetro interno (P/IP) y la cantidad de dientes primarios. Por ende, a mayor temperatura de la estación más húmeda, se tienen hojas más grandes, más redondas y con estomas de mayor tamaño.
- iv) La precipitación del mes más lluvioso (PMLI) se relaciona negativamente con todos los rasgos asociados a tamaño y forma de lámina y estomas, además del número de dientes totales (T) y primarios (PT). Según esto, entonces a mayor PMLI se tendrían hojas más pequeñas, menos redondas, con menos dientes primarios y estomas de menor tamaño.
- v) La precipitación del mes más seco (PMS) presenta las mismas relaciones descritas para la PMLI sumado a una relación negativa con el cociente entre

número de dientes y perímetro total e interno (T/P y T/IP). Por lo que la morfología responde de la misma forma que frente a la PMLI. Además, la relación con T/P y T/IP indica que la disminución de número de dientes y perímetro (dado el menor tamaño) no sería proporcional, sino que primaría la disminución de la cantidad de dientes.

- vi) La precipitación anual (PA) tiene un comportamiento inverso al que presenta la PMS, con los mismos rasgos que ésta. Así, a medida que se tiene mayor magnitud de precipitaciones en un año, se encontrarían individuos con hojas y estomas más grandes, hojas más redondas y con mayor número de dientes, (principalmente primarios).

Los rasgos morfológicos que no presentan una relación significativa con ninguna de las variables climáticas analizadas son: área de dientes (TA), área de dientes promedio (MTA), cociente entre el área de dientes con el perímetro (TA/P), perímetro interno (TA/IP) y área de lámina (TA/LA), el número de dientes secundarios (ST) y la densidad estomática (SD). Por lo tanto, en esta especie en particular, el tamaño de dientes, la cantidad de dientes secundarios y la densidad estomática no varían de forma significativa de acuerdo a las condiciones climáticas a las que se someten los individuos.

Así también, la isothermalidad (IST) no presenta relación significativa con ninguno de los rasgos estudiados, por lo que no tienen una influencia en el comportamiento de éstos.

3.2 *Nothofagus nitida*.

En el análisis de correspondencia canónico (CCA) de *Nothofagus nitida* las variables que tienen mayor correlación con el primer eje canónico son la precipitación del mes más

seco (PMS) y la isothermalidad (IST), mientras que todas las variables de temperatura se asocian al segundo eje canónico. La precipitación anual (PA) y del mes más lluvioso (PMLI) son las de menor relevancia en el análisis. Estos grados de correlación se aprecian en los diagramas de ordenación, según la cercanía de las variables climáticas al eje correspondiente y al largo de la flecha (Figura 9). Entre todas las variables climáticas, la que presenta la mayor correlación con algún eje es la precipitación del mes más seco (PMS), y considerando que el primer eje captura el 73,8% de la variabilidad de los datos, sería esta variable climática la que estaría modelando en mayor grado la distribución de la morfología en el diagrama de ordenación.

3.1.1 Morfología de estomas, lámina y dientes.

La distribución de los rasgos morfológicos en el diagrama de ordenación presenta una separación parcial entre los rasgos referentes a tamaño y forma, tanto de hojas como estomas, de aquellos asociados a los dientes (Figura 9).

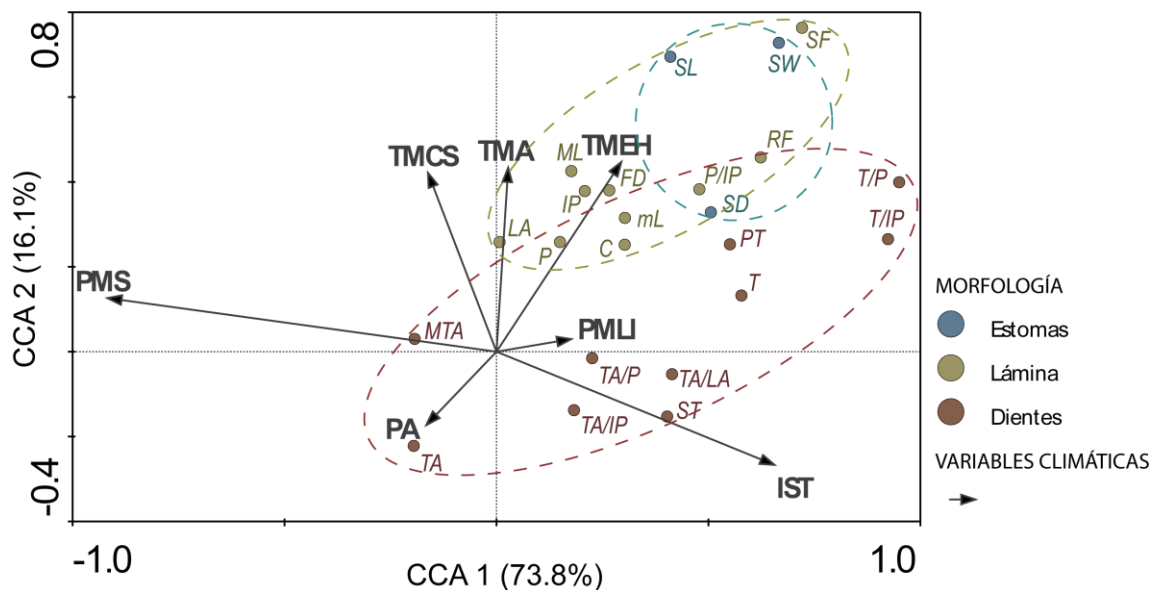


Figura 9 - Biplot obtenido del análisis de correspondencia canónica (CCA) aplicado a la morfología de *N. nitida*. El diagrama muestra la relación entre los 23 rasgos morfológicos¹ (círculos) y 7 variables climáticas² (flechas). Los rasgos morfológicos se clasificaron en tres grupos, diferenciados por color (rasgos de estomas, de la lámina y dientes). Cada grupo fue encerrado con un círculo punteado del color correspondiente.

¹ Nomenclatura de rasgos morfológicos: largo de estoma (SL), ancho de estoma (SW), densidad estomática (SD), área de lámina (LA), perímetro (P), longitud eje mayor (ML) y menor (mL), perímetro interno (IP), factor forma (SF), diámetro de Feret (FD), razón de Feret (RF), compacidad (C), n° dientes totales (T), primarios (PT) y secundarios (ST), área de dientes (TA) y área de dientes promedio (MTA).

² Nomenclatura de variables climáticas: temperatura media anual (TMA), temperatura promedio de la estación más húmeda (TMEH) y más seca (TMCS), isothermalidad (IST), precipitación anual (PA), del mes más seco (PMS) y más lluvioso (PMLI).

Los rasgos estomáticos están contenidos completamente en el grupo de rasgos asociados a la morfología de la lámina, por lo que su comportamiento sería similar. Sin embargo, al observar la distribución de todos los rasgos morfológicos se aprecia que existe una zona de confluencia de rasgos proveniente de las tres clasificaciones (estomas, lámina y dientes). Esta zona incluye densidad estomática, razón de Feret y cociente entre perímetro y perímetro interno.

3.1.2 Relación morfología-clima: significancia

El test de permutaciones de Monte Carlo determinó que sólo la precipitación del mes más seco (PMS) presenta relaciones lineales significativas con la morfología de *N. nitida* (Tabla 8).

Tabla 7 – Valores de p de Pearson obtenidos para cada variable climática en el test de permutaciones de Monte Carlo en el análisis de *N. nitida*. Se destaca en negrita la variable significativa ($p < 0,05$)

	TMA	TMEH	TMCS	IST	PA	PMS	PMLI
<i>p-value</i>	0,56	0,55	0,40	0,91	0,67	0,01	0,90

Al evaluar las relaciones entre las variables climáticas y cada uno de los rasgos morfológicos de *N. nitida*, ninguna variable resultó ser significativa.

4 DISCUSIÓN

4.1 ¿Ambas especies responden morfológicamente a la variación climática?

De acuerdo al porcentaje de varianza acumulada para cada uno de los análisis, el que incluye ambas especies tiene el mayor poder predictivo. Sin embargo, el análisis de *Nothofagus dombeyi* captura mayor variabilidad de los datos comparado con lo obtenido para *Nothofagus nitida*, por lo que se infiere que el poder predictivo del análisis conjunto se debe más bien al comportamiento de la morfología de *N. dombeyi*. De hecho, al contrastarlos se aprecia que en ambos resultados el eje 1 corresponde a una combinación lineal de temperaturas y el eje 2 a una combinación lineal de las precipitaciones, mientras que para *N. nitida* se da lo inverso. Además, en los tres análisis realizados la distribución de los rasgos morfológicos es bastante similar, pero con mayor dispersión en *N. dombeyi*, indicativo de la mayor significancia de este.

Para *N. dombeyi*, sólo la temperatura media anual (TMA) y temperatura promedio de la estación más seca (TMCS) fueron significativas en el test de permutaciones, por lo que estas variables son las que principalmente determinan su respuesta morfológica. Por otro lado, las precipitaciones de los meses más secos y lluviosos (PMS y PMLI respectivamente) se relacionan significativamente con su morfología, diferente a *N. nitida* que sólo es influida por la PMS. Considerando lo anterior, la morfología de *N. dombeyi* puede ser utilizada como indicador de TMA, TMCS, PMS y PMLI.

La mejor relación morfología-clima del Coigüe se debería a su exposición a temperaturas más desfavorables y menor grado de esclerofilia (Alberdi, 1987). Ya que, al presentar mayor transpiración cuticular, es más susceptible a sufrir estrés por déficit hídrico, el que puede ser generado por bajas temperaturas, desarrollando adaptaciones que *N. nitida* no genera.

4.2 Valor predictivo de los caracteres morfológicos

Sólo *N. dombeyi* permite relacionar algunas variables climáticas con la morfología de forma independiente. De ellas, la cantidad de dientes primarios responde significativamente a la PMS, pero se ha descrito que el número de dientes primarios en este género presenta una fuerte señal filogenética (Glade y col., 2018), por lo que la similitud en la respuesta de este rasgo frente al clima se debería más bien a que están relacionados filogenéticamente (Blomberg y col., 2003; Ackerly, 2009). Por tanto, no se puede concluir una relación morfología-clima considerando únicamente esta respuesta morfológica.

Por otro lado, el tamaño de hojas y estomas, y la forma de la lámina son influidos significativamente por las condiciones climáticas. Dentro de ello, la Razón de Feret, Compacidad, y longitud del eje menor y mayor son caracteres morfológicos que no presentan señal filogenética (Glade y col., 2018), por lo que constituyen buenos indicadores paleo-climáticos. El tamaño de estomas presenta la misma tendencia que el tamaño de la lámina, similitud que puede deberse a una relación isométrica entre ambos rasgos, por lo que la variación en el tamaño de estomas probablemente sea

consecuencia de la variación en el tamaño de la lámina. A pesar de ello, su uso como paleo-indicador no es descartable, pero aún está sujeto a la evaluación de la señal filogenética del rasgo. Finalmente, respecto a la morfología de estomas, se determinó que el clima no influye en la densidad estomática para ninguna de las especies analizadas.

4.3 Gradiente latitudinal

En ninguno de los análisis se encontró un gradiente latitudinal dado por la respuesta morfológica a las condiciones climáticas. Sin embargo, la precipitación del mes más seco (PMS) incrementa visiblemente a medida que aumenta la latitud. Tomando esto como referencia, la respuesta morfológica de *N. dombeyi* a la variación de temperatura y precipitación en el gradiente latitudinal, presenta mayoritariamente un comportamiento inverso a lo previsto en la hipótesis de trabajo.

4.4 Déficit hídrico.

Respecto a la variación en el tamaño de hojas y estomas, se esperaba que frente a menores precipitaciones (individuos de bajas latitudes), los estomas y hojas tendieran a ser más pequeños para disminuir la pérdida de agua por evapotranspiración (Bakker, 1991; Dunlap & Stettler, 2001; Figueroa y col., 2010; Pearce D. W. Bray D. F. , and Rood S. B., 2005; Peppe y col., 2011; Yang y col., 2007). Sin embargo, esta característica la presentan individuos expuestos a mayor PMS y PMLI, por lo que el factor estresante no es la escasez de agua por bajas precipitaciones. Más bien, un aumento

en las precipitaciones de los meses extremos (más seco y más lluvioso) genera respuestas morfológicas asociadas a condiciones estresantes. Considerando que los mayores valores de PMS y PMLI se encuentran en las latitudes mayores, donde hay menores temperaturas e incluso presencia de nieve, se podría inferir que el estrés al que responde la morfología de *N. dombeyi* tiene más relación con las bajas temperaturas.

4.4 Estrés por frío.

La relación encontrada entre el tamaño de hojas y estomas con la TMCS apunta hacia una respuesta morfológica asociada al estrés: hojas más pequeñas y con estomas de menor tamaño frente a menores temperaturas. Cabe destacar que el Coigüe se ve expuesto con mayor frecuencia a heladas nocturnas en verano (Alberdi, 1987), lo que podría explicar su sensibilidad morfológica a las bajas temperaturas en la estación más seca.

Se ha determinado que el estrés por frío promueve el cierre estomático (Tambussi & Guiamet, 2004), disminuyendo el tamaño de estomas. Este aumento en el cierre estomático puede deberse al déficit hídrico producido por frío, o a otros factores como un aumento de CO₂ intercelular producto de una menor tasa de asimilación o efectos directos de las bajas temperaturas en los estomas (Allen & Ort, 2001).

Si bien las estrategias de adaptación bioquímica al estrés por frío han sido estudiadas en *N. dombeyi* (Alberdi, 1987; Reyes-Daz y col., 2009), determinando que la radiación solar afecta la intensidad transpiratoria en esta especie (Alberdi, 1987), no se conoce

aún el mecanismo fisiológico detrás de la regulación del cierre estomático. Sin embargo, este estudio añade a dichos antecedentes la respuesta morfológica de la especie a las bajas temperaturas.

4.5 Efecto sinérgico de las temperaturas y precipitaciones.

Se ha descrito que existe interacción entre factores de estrés para las plantas, generando, en muchos casos, efectos sinérgicos (Tambussi & Guiamet, 2004) y dificultando la separación de uno u otro en la respuesta fisiológica.

En este contexto, es necesario enfatizar que la fuerte influencia de la TMCS en la morfología de *N. dombeyi* se da en un escenario multivariado. Si se evalúa la relación lineal de cada una de las variables climáticas con cada uno de los rasgos morfológicos, la mayoría resultan no ser significativas. Esto da cuenta precisamente que la interacción entre las bajas temperaturas y el déficit hídrico tiene un efecto sinérgico, pero el efecto de cada variable por separado no es suficiente para explicar la variabilidad morfológica de ninguna de las especies.

5 CONCLUSIONES

El tamaño de la lámina y estomas de *Nothofagus dombeyi* responde significativamente a la interacción de dos factores estresantes: bajas temperaturas y déficit hídrico, siendo un buen candidato para ser utilizado en predicciones paleo-climáticas. A pesar de ello, no fue posible determinar la existencia de un gradiente latitudinal dado por su respuesta morfológica a las condiciones climáticas, debido probablemente al efecto sinérgico de estos dos factores estresantes.

De los rasgos morfológicos de la lámina, la razón de Feret, compacidad, y longitud del eje mayor y menor pueden ser utilizados como indicador paleo-climáticos dada la significancia de su relación con el clima y que carecen de señal filogenética (Glade y col., 2018)

Respecto a la morfología de estomas, el tamaño de estomas sigue siendo un posible indicador paleo-climático, pero antes de ello es necesario evaluar la señal filogenética que presenta el largo y ancho de estomas. No así el caso de la densidad estomática, que se descarta como indicador paleo-climático para estas especies.

Finalmente, a excepción de la forma de la hoja, no se cumplieron las predicciones realizadas para la respuesta morfológica. Sin embargo, fue posible establecer que las bajas temperaturas son el principal determinante en el tamaño foliar y de estomas en *N. dombeyi*. Esto constituye un nuevo antecedente para dilucidar, a futuro, los mecanismos fisiológicos que regulan la respuesta morfológica al estrés por frío.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Ackerly, D. (2009). Conservatism and diversification of plant functional traits: Evolutionary rates versus phylogenetic signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(Supplement_2), 19699–19706. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901635106>
- Alberdi, L. (1987). ECOFISIOLOGIA DE ESPECIES CHILENAS DEL GENERO *NOTHOFAGUS*. *Bosque*, 8(2), 77–84.
- Allen, D. J., & Ort, D. R. (2001). Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science*, 6(1), 36–42.
- Bailey, I. W., & Sinnott, E. W. (1916). The Climatic Distribution of Certain Types of Angiosperm Leaves. *American Journal of Botany*, 3(1), 24–39.
- Bakker, J. C. (1991). Effects of humidity on stomatal density and its relation to leaf conductance. *Scientia Horticulturae*, 48(3–4), 205–212. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(91\)90128-L](https://doi.org/10.1016/0304-4238(91)90128-L)
- Beerling, D. J., & Royer, D. L. (2002). Reading a CO₂ signal from fossil stomata. *New Phytologist*, 153(3), 387–397. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00335.x>
- Blomberg, S. P., Garland, T., & Ives, A. R. (2003). Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution*, 57(4), 717–745. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00285.x>
- Christmann, A., Weiler, E. W., Steudle, E., & Grill, E. (2007). A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *Plant Journal*, 52(1), 167–174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03234.x>
- Damour, G., Simonneau, T., Cochard, H., & Urban, L. (2010). An overview of models of

- stomatal conductance at the leaf level. *Plant, Cell and Environment*, 33(9), 1419–1438. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02181.x>
- Donoso, C. (1987). Variación natural en especies de *Nothofagus* en Chile. *Bosque*, 8(2), 85–97. Retrieved from <http://mingaonline.uach.cl/pdf/bosque/v8n2/art03.pdf>
- Dunlap, J. M., & Stettler, R. F. (2001). Variation in leaf epidermal and stomatal traits of *Populus trichocarpa* from two transects across the Washington Cascades. *Canadian Journal of Botany*, 79, 528–536. <https://doi.org/10.1139/b01-029>
- Fick, S.E. and R.J. Hijmans. (2017). Worldclim 2: New 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*.
- Figueroa, J. A., Cabrera, H. M., Queirolo, C., & Hinojosa, L. 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(5), 574–585. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq016>
- Glade-Vargas, N., Hinojosa, L. F., & Leppe, M. (2018). Evolution of climatic related leaf traits in the family nothofagaceae. *Frontiers in Plant Science*, 9
- Hinojosa, L. F., Gaxiola, A., Pérez, M. F., Carvajal, F., Campano, M. F., Quattrocchio, M., ... Arroyo, M. T. K. (2016). Non-congruent fossil and phylogenetic evidence on the evolution of climatic niche in the Gondwana genus *Nothofagus*. *Journal of Biogeography*, 43(3), 555–567. <https://doi.org/10.1111/jbi.12650>
- Hinojosa, L. F., Pérez, F., Gaxiola, A., & Sandoval, I. (2011). Historical and phylogenetic constraints on the incidence of entire leaf margins: Insights from a new South American model. *Global Ecology and Biogeography*, 20(3), 380–390. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2010.00595.x>
- Hinojosa, L. F., & Villagrán, C. (2005). Did South American Mixed Paleofloras evolve under thermal equability or in the absence of an effective Andean barrier during the

- Cenozoic? *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 217(1–2), 1–23.
<https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2004.11.013>
- Huff, P. M., Wilf, P., & Azumah, E. J. (2003). Digital future for paleoclimate estimation from fossil leaves? Preliminary results. *Palaios*, 18(3), 266–274.
[https://doi.org/10.1669/0883-1351\(2003\)018<0266:DFPPEF>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1669/0883-1351(2003)018<0266:DFPPEF>2.0.CO;2)
- Lepš, J., & Šmilauer, P. (2003). *Multivariate analysis of ecological data using CANOCO*. (Cambridge University Press, Ed.).
- Luebert, F., & Pliscoff, P. (2006). Sinopsis bioclimática y vegetacional de Chile. *Editorial Universitaria*, 77-86.
- Pearce D. W. Bray D. F. , and Rood S. B., M. S. (2005). Stomatal characteristics of riparian poplar species in a semi-arid environment. *Tree Physiology*, 26, 211–218.
<https://doi.org/none>
- Peppe, D. J., Royer, D. L., Cariglino, B., Oliver, S. Y., Newman, S., Leight, E., ... Wright, I. J. (2011). Sensitivity of leaf size and shape to climate: Global patterns and paleoclimatic applications. *New Phytologist*, 190(3), 724–739.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03615.x>
- Ramirez, C. (1987). The genus *Nothofagus* and his importance in Chile. *Bosque*, 8(2), 71–76.
- Reyes-Daz, M., Ivanov, A. G., Huner, N. P. A., Alberdi, M., Corcuera, L. J., & Bravo, L. A. (2009). Thermal energy dissipation and its components in two developmental stages of a shade-tolerant species, *Nothofagus nitida*, and a shade-intolerant species, *Nothofagus dombeyi*. *Tree Physiology*, 29(5), 651–662.
<https://doi.org/10.1093/treephys/tpp003>
- Royer, D. L. (2001). Stomatal density and stomatal index as indicators of paleoatmospheric CO₂ concentration. *Review of Palaeobotany and Palynology*,

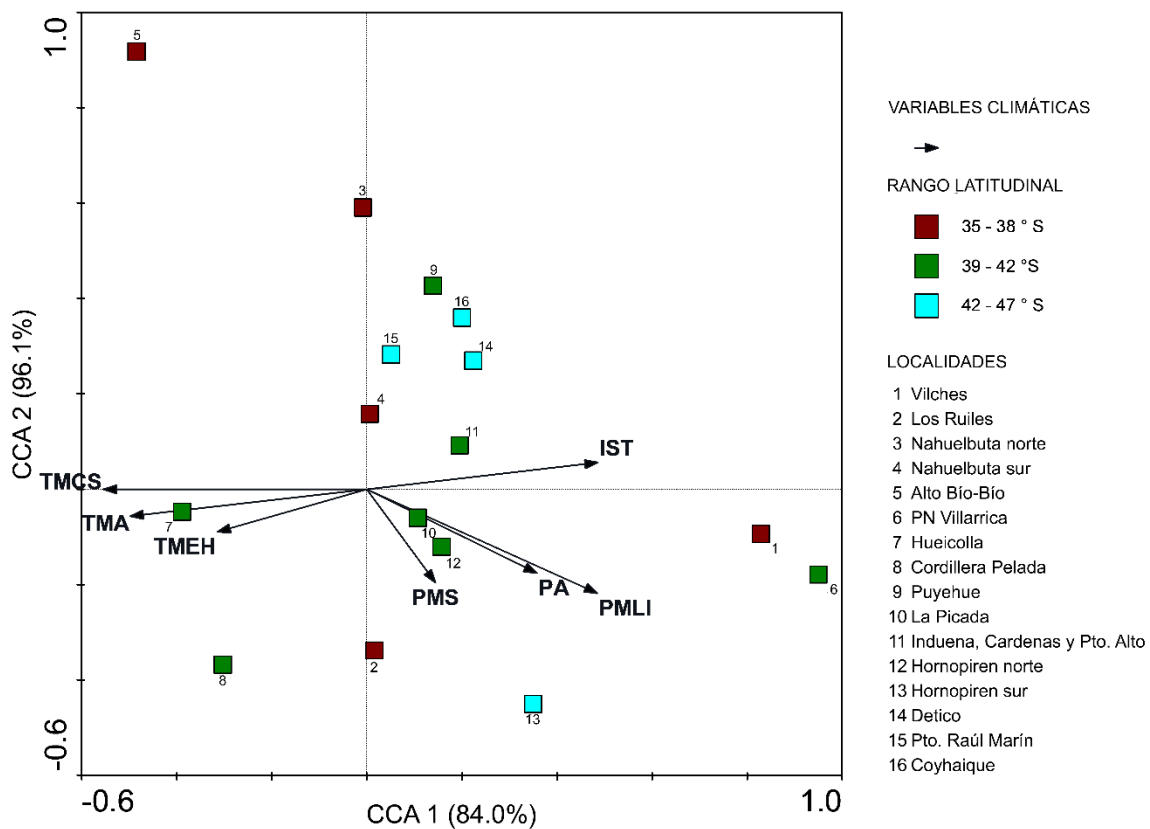
- 114(1–2), 1–28. [https://doi.org/10.1016/S0034-6667\(00\)00074-9](https://doi.org/10.1016/S0034-6667(00)00074-9)
- Royer, D. L., & Wilf, P. (2006). Why Do Toothed Leaves Correlate with Cold Climates? Gas Exchange at Leaf Margins Provides New Insights into a Classic Paleotemperature Proxy. *International Journal of Plant Sciences*, 167(1), 11–18. <https://doi.org/10.1086/497995>
- Royer, D. L., Wilf, P., Janesko, D., Kowalski, E., & Dilcher, D. (2005). of Climate and Plant Ecology To Fossil Record 1. *American Journal of Botany*, 92(7), 1141–1151. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.7.1141>
- Tambussi, E. A., & Guiamet, J. J. (2004). Fotosíntesis, fotoprotección, productividad y estrés abiótico: algunos casos de estudio. *Memoria Presentada a La Universidad de Barcelona, Facultad de Biología*. <https://doi.org/10.1039/B304944B>
- Ter Braak, C. J. F. (1986). Canonical Correspondence Analysis : A New Eigenvector Technique for Multivariate Direct Gradient Analysis. *Ecology*, 67(5), 1167–1179.
- Ter Braak, C. J. F., & Prentice, I. C. (2004). A Theory of Gradient Analysis. *Advances in Ecological Research*, 34(3), 271–317. [https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(03\)34003-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(03)34003-6)
- Villagran, C., & Hinojosa, L. F. (1997). Historia de los bosques del sur de Sudamérica, II: Análisis fitogeográfico. *Revista Chilena de Historia Natural*. Retrieved from <http://rchn.biologiachile.cl/en/contents/1997v70n2.php>
- Wolfe, J. A., California, U., & Calif, U. S. A. (1971). TERTIARY CLIMATIC FLUCTUATIONS AND METHODS OF ANALYSIS OF TERTIARY FLORAS. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 9(1967), 27–57.
- Yang, L., Han, M., Zhou, G., & Li, J. (2007). The changes of water-Use efficiency and stoma density of *Leymus chinensis* along Northeast China Transect. *Acta Ecologica Sinica*, 27(1), 16–24. [https://doi.org/10.1016/S1872-2032\(07\)60006-7](https://doi.org/10.1016/S1872-2032(07)60006-7)

Zhang, L., Niu, H., Wang, S., Zhu, X., Luo, C., Li, Y., & Zhao, X. (2012). Gene or environment? Species-specific control of stomatal density and length. *Ecology and Evolution*, 2(5), 1065–1070. <https://doi.org/10.1002/ece3.233>

ANEXO

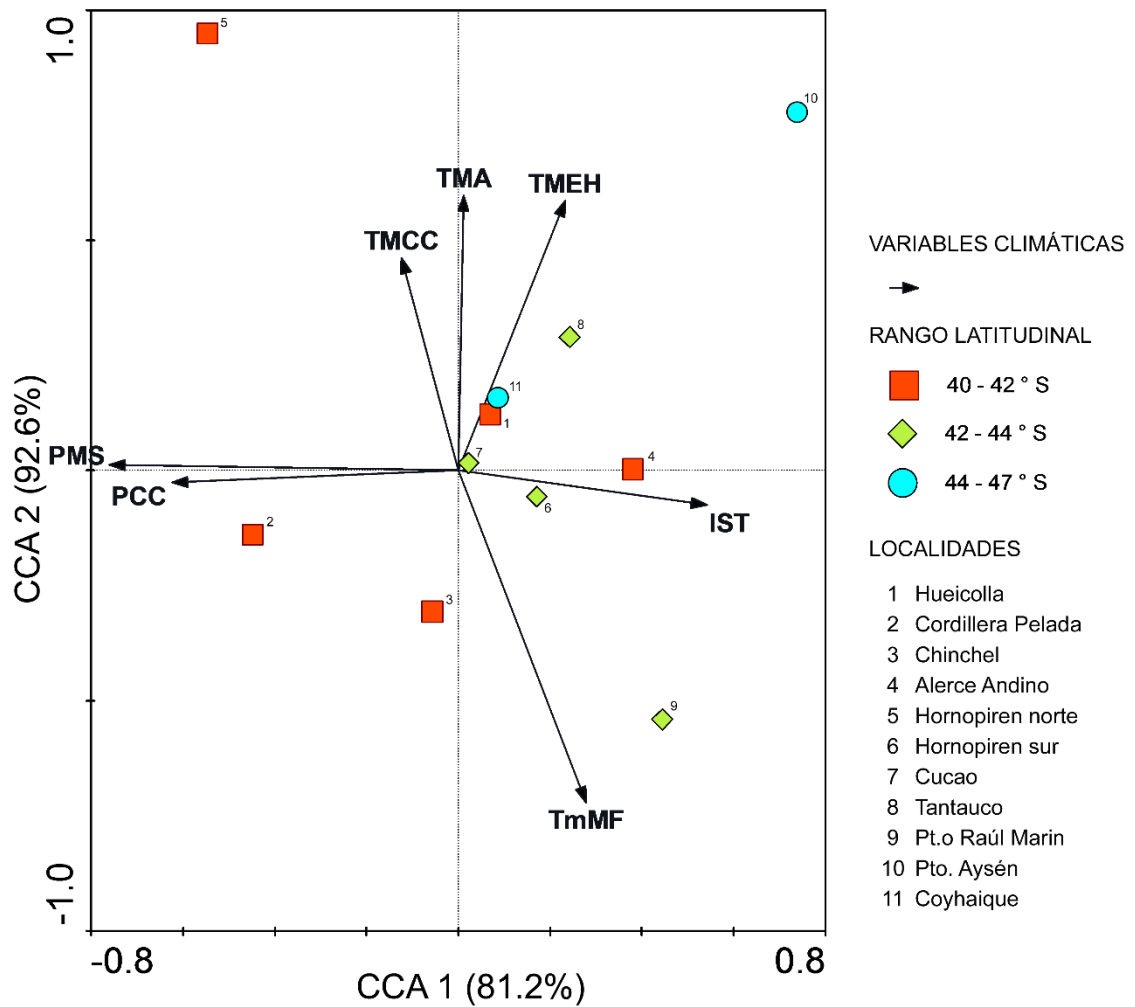
Anexo 1: Biplot obtenido del análisis de correspondencia canónica (CCA) aplicado a la morfología de *Nothofagus dombeyi*. El diagrama muestra la relación entre las localidades estudiadas (cuadros) y 7 variables climáticas¹ (flechas). Las localidades se clasifican en tres grupos según rango latitudinal, los que se muestran con diferentes colores.

¹Nomenclatura de variables climáticas: temperatura media anual (TMA), temperatura promedio de la estación más seca (TMCS) y más húmeda (TMEH), isothermalidad (IST), precipitación anual (PA), del mes más lluvioso (PMLI) y más seco (PMS).



Anexo 2: Biplot obtenido del análisis de correspondencia canónica (CCA) aplicado a la morfología de *Nothofagus nitida*. El diagrama muestra la relación entre las localidades estudiadas (cuadros) y 7 variables climáticas¹ (flechas). Las localidades se clasifican en tres grupos según rango latitudinal, los que se muestran con diferentes colores.

¹Nomenclatura de variables climáticas: temperatura media anual (TMA), temperatura promedio de la estación más cálida (TMCC) y más húmeda (TMEH), temperatura mínima del mes más frío (TmMF), isothermalidad (IST), precipitación de la estación más cálida (PCC) y del mes más seco (PMS).



Anexo 3: p de Pearson de las regresiones lineales entre cada rasgo morfológico y cada una de las variables de temperatura utilizadas en el análisis multivariado. En negrita se muestran las relaciones significativas (p-value<0.05).

	Rasgo	TMA	RDP	IST	TE	TMMC	TmMF	RAT	TMEH	TMCS	TMCC	TMCF
Morfología de estomas	SL	0.30	0.84	0.88	0.59	0.66	0.31	0.76	0.19	0.29	0.46	0.19
	SW	0.77	0.32	0.72	0.23	0.48	0.40	0.27	0.43	0.80	0.86	0.46
	SD	0.79	0.67	0.40	0.14	0.47	0.77	0.44	0.74	0.66	0.48	0.76
Tamaño de la lámina	LA	0.42	0.54	0.29	0.07	0.20	0.96	0.30	0.82	0.30	0.18	0.94
	P	0.34	0.75	0.20	0.17	0.24	0.72	0.49	0.57	0.30	0.18	0.69
	IP	0.36	0.52	0.34	0.09	0.16	0.91	0.31	0.69	0.22	0.15	0.80
	P/IP	0.99	0.81	0.48	0.92	0.97	0.83	0.86	0.89	0.73	0.98	0.96
Forma de la lámina	C	0.68	0.99	0.57	0.97	0.67	0.62	0.98	0.61	0.73	0.69	0.66
	SF	0.92	0.84	0.83	0.98	0.72	0.86	0.87	0.84	0.95	0.91	0.89
	ML	0.41	0.47	0.52	0.15	0.17	0.91	0.32	0.69	0.20	0.20	0.78
	mL	0.39	0.91	0.10	0.08	0.35	0.90	0.52	0.76	0.46	0.18	0.89
	FD	0.37	0.58	0.26	0.07	0.19	0.94	0.33	0.73	0.27	0.15	0.85
	RF	0.79	0.63	0.51	0.81	0.58	0.77	0.80	0.66	0.35	0.83	0.64
Dientes	TA	0.55	0.66	0.37	0.29	0.30	0.83	0.50	0.78	0.66	0.37	0.86
	TA/LA	0.77	0.39	0.60	0.76	0.55	0.70	0.47	0.71	0.73	0.89	0.70
	TA/P	0.90	0.40	0.87	0.34	0.33	0.81	0.35	0.87	1.00	0.66	0.80
	TA/IP	0.85	0.56	0.69	0.43	0.41	0.93	0.48	0.97	1.00	0.66	0.90
	PT	0.35	0.82	0.90	0.50	0.40	0.67	0.70	0.53	0.26	0.30	0.53
	ST	0.61	0.54	0.35	0.71	0.96	0.43	0.59	0.51	0.89	0.74	0.51
	T	0.80	0.64	0.67	0.56	0.62	0.86	0.61	1.00	0.58	0.69	1.00
	MTA	0.33	0.28	0.47	0.05	0.06	0.96	0.15	0.73	0.25	0.12	0.83
	T/P	0.13	0.73	0.23	0.10	0.12	0.52	0.44	0.32	0.08	0.05	0.41
	T/IP	0.20	0.69	0.41	0.15	0.17	0.63	0.46	0.42	0.11	0.10	0.50

Anexo 4: p de Pearson de las regresiones lineales entre cada rasgo morfológico y cada una de las variables de precipitación utilizadas en el análisis multivariado. En negrita se muestran las relaciones significativas ($p\text{-value}<0.05$).

	Rasgo	PA	PMLI	PMS	PE	PCLI	PCS	PCC	PCF
Morfología de estomas	SL	0.54	0.43	0.67	0.49	0.55	0.57	0.75	0.59
	SW	0.80	0.32	0.66	0.66	0.44	0.82	0.69	0.48
	SD	0.35	0.41	0.53	0.45	0.47	0.39	0.42	0.46
Tamaño de la lámina	LA	0.20	0.07	0.95	0.80	0.11	0.69	0.82	0.09
	P	0.48	0.46	0.90	0.87	0.46	0.87	0.97	0.37
	IP	0.32	0.26	0.92	0.73	0.29	0.72	0.88	0.22
	P/IP	0.75	0.49	0.79	0.89	0.58	0.87	1.00	0.65
Forma de la lámina	C	0.35	0.07	0.83	1.00	0.11	0.80	0.84	0.16
	SF	0.47	0.08	0.92	0.86	0.15	0.99	0.96	0.20
	ML	0.52	0.68	0.81	0.62	0.66	0.68	0.86	0.55
	mL	0.13	0.01	0.71	0.84	0.02	0.96	0.96	0.01
	FD	0.19	0.09	0.98	0.80	0.11	0.71	0.85	0.08
	RF	0.32	0.01	0.62	0.54	0.04	0.84	0.97	0.05
Dientes	TA	0.86	0.77	0.91	1.00	0.94	0.94	0.89	0.90
	TA/LA	0.53	0.05	0.72	0.76	0.12	0.79	0.65	0.18
	TA/P	0.85	0.49	0.80	0.83	0.75	0.73	0.64	0.91
	TA/IP	0.96	0.48	0.94	0.92	0.70	0.85	0.75	0.84
	PT	0.72	0.46	0.70	0.65	0.41	0.82	0.88	0.39
	ST	0.91	0.71	0.85	0.97	0.82	0.93	0.95	0.85
	T	0.79	0.54	0.90	0.78	0.56	0.94	0.96	0.56
	MTA	0.53	0.86	1.00	0.95	0.61	0.80	0.72	0.47
	T/P	0.39	0.21	0.60	0.72	0.18	0.85	0.76	0.12
	T/IP	0.38	0.20	0.73	0.80	0.18	0.93	0.82	0.13