

UCH-FC
B. Ambiental
S 165V
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO



VARIACIÓN DE LA FISIONOMÍA FOLIAR DE *NOTHOFAGUS DOMBEYI* (MIRB). OERST. A LOS CAMBIOS CIMÁTICOS DEL PASADO

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

BIÓLOGO CON MENCIÓN EN MEDIO AMBIENTE

por

FRANCISCO MANUEL SALINAS GARCÍA

Director del Seminario de Título:
DR. LUIS FELIPE HINOJOSA

Junio 2014



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

FRANCISCO MANUEL SALINAS GARCÍA

VARIACIÓN DE LA FISIONOMÍA FOLIAR DE *NOTHOFAGUS DOMBEYI* (MIRB). OERST. A LOS CAMBIOS CIMÁTICOS DEL PASADO

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Bióloga con Mención en Medio Ambiente.

Luis Felipe Hinojosa Opazo
Director Seminario de Título

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Alejandra González Vásquez
Presidente Comisión

Dr. Rodrigo Villa Martínez
Evaluador

Santiago de Chile, julio de 2013

Índice



Abstract	1
Resumen	2
1. Introducción	3
1.1 Hipótesis:	10
1.2 Objetivo general:	10
1.3 Objetivos específicos:	11
2. Métodos	
2.1 Lugares de estudio	12
2.2 Clima	15
2.3 Preparación de las muestras	17
2.4 Análisis foliar digital	18
2.5 Análisis estadísticos:	19
3. Resultados	
3.1 Hojas subfósiles del yacimiento Caunahue	21
3.2 Hojas actuales en un gradiente latitudinal	26
3.3 Comparación de rasgos significativos entre hojas actuales obtenidas de la hojarasca y de herbarios pertenecientes al sector de Caunahue	32
4. Discusión	
4.1 Temperatura como modulador de los cambios fisionómicos de <i>N. dombeyi</i>	33
4.2 Rasgos que cambian con la temperatura en <i>N. dombeyi</i>	34
4.3 ¿Plasticidad fenotípica o diferencia genotípica?	37
5. Conclusiones	38
6. Referencias	39
ANEXO I	43
ANEXO II	44
ANEXO III	45
ANEXO IV	46

Abstract

The morphology of dicotyledonous leaves is used as climate indicator in the place they grow. Thus, in cold climates an increased number of teeth and degree of dissection of leaves is expected, compared to warmer areas. Also, in locations with high rainfall, leaf area is greater than in drier places. These associations between leaf traits and climate have been used by paleoecologists to reconstruct past climates using leaf fossils. An assumption associated with this work is that the leaves would be plastic enough to respond to climate change. Therefore, it is possible to predict contrasting climate scenarios, over time, because the leaf traits should vary modifying their physiognomy. In this work, we compare the foliar physiognomy of the species *Nothofagus dombeyi* at both level present and in the past (Quaternary) in order to determine if the traits covary according to the mean annual temperature (MAT). Our results indicate that the number of primary teeth (nDP) is positively associated with the MAT in both cases: subfossils and current leaves. In this way, we confirm a positive relationship between leaf physiognomy of *N. dombeyi* with MAT, but this relationship is inverse to the previously predicted by the literature.

Resumen

Las morfologías de las hojas de dicotiledóneas se utilizan como indicadores del clima del lugar donde crecen. Así, en lugares con climas fríos dominan hojas con un mayor número de dientes y grado de disección en comparación con las hojas de zonas cálidas. Además, en zonas con alta precipitación el área de lámina es mayor que en zonas más secas. Estas asociaciones entre los rasgos de la hoja y el clima han sido utilizadas por los paleoecólogos para reconstruir climas pasados usando fósiles de hojas. Un supuesto asociado a estos trabajos es que las hojas serían lo suficientemente plásticas a la hora de responder a los cambios climáticos. Así, es posible predecir que ante escenarios de clima contrastante, a través del tiempo, los rasgos foliares deberían variar modificando su fisionomía. En este trabajo se compara la fisionomía foliar de la especie *Nothofagus dombeyi* tanto en el presente como en el pasado (15 a 5 mil años calendario) para determinar los rasgos que varían de acuerdo a la temperatura media anual (TMA). Los resultados indican que el rasgo número de dientes primarios (nDP) se asocia positivamente a la TMA tanto en las hojas subfósiles como en las actuales. Se concluye que sí existe una relación entre la fisionomía foliar de *Nothofagus dombeyi* con la TMA, pero esta relación es inversa a lo predicho por la literatura.

1. Introducción

Debido a que las plantas son sésiles están sujetas a cambios climáticos de forma directa, por lo que ante variaciones climáticas la comunidad vegetal puede presentar modificaciones a un nivel interespecífico, con la desaparición y colonización de nuevas especies a la comunidad. Paralelamente, en el rango de distribución pueden ocurrir cambios intraespecíficos relacionados a la variación morfológica y fisiológica dentro de cada especie. Estos cambios intra e interespecíficos pueden ser observados en el registro fósil, y han sido utilizadas por los paleobotánicos para reconstruir climas pasados (Greenwood & Wing, 1995; Kowalski & Dilcher 2003; Hinojosa y col, 2006; Taylor y col, 2009; Dilcher y col, 2009; Reichgelt y col, 2013). Una de las herramientas de la paleobotánica para reconstruir paleoclimas es la fisionomía foliar basada en la relación moderna entre clima y rasgos fisionómicos (Taylor y col, 2009). Esta metodología, utiliza los análogos modernos en donde se analizan las características morfológicas de las hojas de las comunidades de dicotiledóneas que se encuentran habitando distintos climas para generar modelos actualistas sobre los cuales es posible estimar paleoclimas utilizando la fisionomía de las hojas de un yacimiento fósil (Jackson & Williams, 2004).

Historia del análisis fisionómico foliar

Los primeros en publicar sobre este tipo de relaciones entre morfología foliar de plantas y el clima a un nivel interespecífico, fueron Bailey & Sinnott (1915, 1916), quienes mediante una revisión bibliográfica del tipo de borde de las hojas, dentado y

entero, específicamente en especies de dicotiledóneas leñosas ubicadas en sectores de Norte América, Sur América, Europa, Asia, África, Australasia y Oceanía, encontraron una asociación entre el porcentaje de especies con hojas de borde entero y el clima en el que se encuentra la comunidad vegetal. En general, los autores sugieren que esta asociación indica que la comunidad vegetal de sectores tropicales y subtropicales presentaría una mayor proporción de dicotiledóneas leñosas de borde entero (>70%). Mientras que en regiones de climas templado fríos esta proporción disminuye entre un 44 a 24%. Adicionalmente, proponen que la comparación del porcentaje de especies con borde foliar entero, entre floras actuales y fósiles, permitiría estimar las condiciones climáticas generales de floras que existieron en el Cretácico y Terciario. Este trabajo permitió generar los primeros modelos fisionómicos univariados para estimar temperaturas pasadas (Chaney & Sanborn, 1933).

En la década de los 90' apareció un nuevo modelo fisionómico interespecífico más complejo, que incluye más de una variable conocido como el "análisis climático foliar multivariado" o CLAMP, propuesto por Wolfe (1993). Este incluye 31 caracteres foliares, los que se relacionan con variables climáticas de precipitación y temperatura a través del análisis de correspondencia canónica. Este método se ha utilizado para estimar condiciones climáticas del terciario en el hemisferio norte (Greenwood & Wing, 1995; Wilf y col, 1998; Su y col, 2013) y sur (Hinojosa y col, 2006; Steart y col, 2010; Reichgelt y col, 2013). Aun cuando este método incluye mayor cantidad de caracteres que los univariados, este no han sido más preciso en las estimaciones climáticas, debido a que existe ambigüedad en la definición y asignación de los valores a los rasgos categóricos y por ende la estimación depende mucho del criterio de quien analiza las muestras (Jordan, 1997; Wilf, 1997, Wiemann y col, 1998)

El método más reciente es el "Análisis Fisonómico Digital", propuesto por Huff y col,(2003) y complementado por Royer y col, (2005). Éste utiliza 21 rasgos foliares cuantitativos basados principalmente en medidas de dientes, lámina y grado de disección foliar, rasgos que han mostrado plasticidad fenotípica en respuesta al clima (Royer y col, 2009). La asociación entre fisionomía y clima que se ha observado al analizar la flora de 92 sitios distribuidos en todo el continente Americano, Asia, Islas Caribeñas y Oceanía, indica que hojas de climas fríos presentan mayor grado de disección foliar, mayor número y tamaño de dientes. Contrariamente, en climas cálidos las hojas presentan menor cantidad de dientes y son de menor tamaño. Además en relación a la humedad, se observa una correlación positiva entre la precipitación media anual y el área de lámina (Huff y col, 2003; Royer y col, 2005; Peppe y col, 2011). La ventaja de este método en comparación con CLAMP, es que las mediciones son cuantitativas en vez de cualitativas, lo que disminuye el error asociado al investigador, (Huff 2003; Peppe y col, 2011).

Causas de la relación entre fisionomía y clima.

Aun cuando no se ha demostrado la razón fisiológica determinante que explique las relaciones descritas anteriormente entre fisionomía foliar y el clima, se han propuesto diferentes hipótesis. Wliff (1997), sugiere que los dientes foliares permiten impulsar el flujo de sabia a través de la hoja vía transpiración y gutación. Baker & Peet (1997), reportaron que en los dientes y lóbulos foliares habría una optimización de la fotosíntesis, lo cual permitiría maximizar el desarrollo foliar en la temporada de crecimiento, cuando hay mayor luz disponible en el dosel. Por otra parte la disponibilidad de agua en el ambiente también influenciaría el desarrollo de dientes

dado que estos serían sitios donde habría una mayor tasa de transpiración lo que explicaría la baja cantidad de especies con borde dentado en ambientes secos (Canny, 1990; Wolfe 1993, Royer & Wilf, 2006). Finalmente, se ha propuesto que los dientes prevendrían el exceso de agua en la hoja causada por la presión positiva de las raíces mediante la gutación, en ambientes muy húmedos , pero esto ha sido demostrado sólo para la especie *Chloranthus japonicus* (Feild y col, 2005)

Estudio a un nivel intraespecífico

Todos los métodos antes mencionados han sido utilizados principalmente para estimar climas pasados del terciario a partir de estudios interespecíficos es decir, analizando los cambios que se producen en la comunidad vegetal y sólo algunos estudios se han enfocado en las variaciones morfológicas foliares a un nivel intraespecífico. No obstante, Royer y col (2008) analiza mediante el método de fisionomía digital, los cambios morfológicos foliares de dos especies de América del Norte: *Acer rubrum* y *Quercus kelloggii*, en un gradiente latitudinal y por ende en un gradiente térmico. Sus resultados mostraron que la especie *A. rubrum* presenta un mayor grado de sensibilidad morfológica a la temperatura media anual (TMA) que *Q. kelloggii*, ya que las hojas de *A. rubrum* aumentaron el número y área de dientes en los climas fríos, pero *Q. kelloggii* no mostró diferencias significativas en su fisionomía a través del gradiente ambiental. Este trabajo evidencia que no todas las especies responden de igual forma a las variaciones térmicas.

De acuerdo a lo anterior no serían los mismos factores los que modulan la variación de los rasgos en todas las especies. Al analizar la fisionomía de dicotiledóneas leñosas de distintos continentes, se ha observado que algunos rasgos

no responden sólo a factores ambientales, sino que también existiría un componente histórico que debe ser considerado al momento de analizar la fisionomía vegetal. De acuerdo a lo anterior se ha encontrado que el rasgo "tipo de borde foliar", presenta una fuerte señal filogenética (Hinojosa y col, 2011) lo cual implica que algunas de las especies que componen las comunidades vegetales presentan un tipo de borde foliar particular. Este no sería por causas climáticas sino que se debería a causas filogenéticas, por lo que las comunidades vegetales que tienen historias comunes y por ende comparten especies filogenéticamente cercanas presentarían proporciones similares de especies con algún tipo de borde foliar particular. Un ejemplo de esto es el género *Myrceugenia*, cuyas especies presentan borde entero independientemente si se encuentra en regiones tropicales o templadas de América del Sur (Landrum, 1988). En este contexto, se cree que al estudiar el grado de variación morfología foliar intraespecífica, es posible identificar las especies y los rasgos que mejor reflejen las condiciones climáticas, permitiendo complementar los métodos fisionómicos actuales.

***Nothofagus dombeyi* como modelo de estudio**

Nothofagus dombeyi es un árbol endémico de los bosques subantárticos de Chile y Argentina. En Chile se distribuye desde la provincia de Colchagua (34° S; 70° O) hasta la provincia de Aisén (45° S; 72° O) siendo uno de los árboles de la vegetación chilena más frecuente, desarrollándose en el sur de Chile bajo condiciones higrófilas y poco cálidas (Rodríguez y col, 1983). Esta especie siempreverde se caracteriza por tener una disposición foliar alterna, hojas de margen doblemente aserrado, lámina aovado - lanceolado y ápice agudo (Hoffmann, 1982).

Los estudios sobre la fisionomía foliar de esta especie, sólo se han realizado a un nivel interespecífico con especies del mismo género (Premoli 1996; Ramírez y col, 1997), no existiendo estudios sobre la variación morfológica intraespecífica de esta especie asociada al clima o latitud.

Un buen modelo para estudiar la variación intraespecífica en el tiempo, se encuentra en el yacimiento fósil del río Caunahue, en la XIV Región de los Ríos, Chile (40° S; 72° O). En este yacimiento se han recuperado hojas subfósiles en sedimentos datados entre los 15.500 y 5.000 años calendario antes del presente, tiempo que abarca la última terminación glacial y el Holoceno medio.

El análisis de las hojas encontradas en estos dos grandes períodos, muestra en la etapa final de la última terminación glacial el bosque era del tipo Norpatagónico compuesto principalmente por las especies de *Nothofagus dombeyi* y mirtáceas. Mientras que en el Holoceno medio, se encuentra un bosque Valdiviano compuesto por *Eucryphia cordifolia* y *Aextoxicon punctatum* y *N. dombeyi*, siendo esta última la especie más abundante en ambos períodos (Hinojosa, datos no publicados).

Esta transición de bosque Norpatagónico a un bosque Valdiviano también se ha descrito para el sector del lago Condorito (41° 45'S; 73° 7'O), que se encuentra dentro de la región del yacimiento Caunahue (Moreno, 2004), donde entre los 15.000 y 13000 años la presencia de un bosque Norpatagónico se asocia a condiciones climáticas frías y húmedas. Entre 6.700 y 5.000 años la presencia de bosque Valdiviano indicaría un clima más cálido y con menores montos de precipitaciones (Moreno y col, 2010).

Estimaciones de temperatura superficial marina basados en la saturación de alquenona (Kaiser y col, 2005) a los 41 ° latitud Sur, muestran una diferencia térmica aproximada de 2°C entre 15.537 - 13.176, temperatura media anual mínima de 12 ° C, y el período entre los 6.738 a 4.999 años, con una máxima de 13.7 °C.

De acuerdo a estos antecedentes es posible realizar un análisis fisionómico a un nivel intraespecífico de la especie *Nothofagus dombeyi*, con el fin de contestar las siguientes preguntas:

.- ¿*Nothofagus dombeyi* presentó cambios fisionómicos foliares entre los períodos climáticamente contrastantes de 15.5 – 13.1 mil y 6.7 - 5 mil años antes del presente?

.- ¿Las hojas de *N. dombeyi* del período más frío, tuvieron mayor número de dientes que las del período más cálido, y las hojas del período más húmedo tuvieron una mayor área foliar en relación al período más seco?

.- Si se analiza la fisionomía de esta especie en un gradiente latitudinal y por ende climático, ¿es posible observar cambios similares a los ocurridos en el pasado?

1.1 Hipótesis:

Dado que existe una relación entre la fisionomía foliar de las dicotiledóneas leñosas y el clima del lugar donde habitan, se espera que:

i) Las hojas de *Nothofagus dombeyi* que habitan en ambientes más fríos y húmedos tengan un mayor valor para los rasgos relacionados al área de lámina, disección foliar, número de dientes y área de dientes, en comparación con los valores obtenidos para las hojas del período más cálido y seco.

ii) Las hojas actuales de *N. dombeyi* en el gradiente latitudinal presenten similar relación entre su fisionomía y clima que las hojas subfósiles del Caunahue.

1.2 Objetivo general:

El objetivo de este Seminario de Título es medir e identificar rasgos foliares de la especie *Nothofagus dombeyi*, que pudieran haber cambiado en relación a las diferencias climáticas entre los períodos 15.5 -13 mil años y 6.7-,5 mil años. Adicionalmente verificar si se mantienen estas relaciones con hojas actuales en un gradiente latitudinal, lo que daría cuenta de la variabilidad fisionómica de *N. dombeyi* al clima.

1.3 Objetivos específicos:

- Medir 21 rasgos foliares cuantitativos de acuerdo a la metodología propuesta por Huff y col, (2003) y Royer y col, (2005) de forma digital, para las hojas de *N. dombeyi* extraídas del yacimiento fósil Caunahue y de hojas actuales herborizadas.
- Identificar los rasgos que diferencian morfológicamente las hojas fósiles de los dos períodos climáticamente distintos y paralelamente, de las hojas actuales que se encuentran en un gradiente latitudinal.
- Correlacionar estos rasgos con estimaciones de temperatura obtenidas para la Región de los Ríos entre los 15.500 y 5000 años y paralelamente correlacionar los rasgos de las hojas actuales con las estimaciones de temperatura media anual y precipitación media anual, obtenidas de estaciones meteorológicas.
- Determinar si existen variaciones morfológicas para los mismos rasgos foliares, entre las hojas fósiles y actuales.
- Evaluar el efecto tafonómico sobre los rasgos que se relacionan significativamente con la temperatura media anual.

2. Métodos

2.1 Lugares de estudio

Yacimiento fósil Caunahue: El yacimiento fósil se ubica en la Región de los Ríos (40°S; 72°O) en la ribera del río Caunahue, que es afluente del lago Ranco. Las hojas subfósiles se encuentran dentro de material sedimentario en forma estratificada (Anexo I). Se identificaron 10 niveles estratigráficos, los cuales fueron datados mediante Carbono 14 con espectrometría de masas utilizando muestras vegetales (Universidad de Georgia). Las edades radiocarbónicas se transformaron a años calendario con el software CALIB 7.0.2 (Stuiver & Reimer, 1993) (Tabla 1). Los sedimentos con material vegetal fueron tratados con KOH para separar las hojas del material sedimentario. Los niveles contenían principalmente hojas de *Berberis darwinii*, *Eucryphia cordifolia*, *Gaultheria mucronata*, *Nothofagus dombeyi*, *Amomyrtus sp* (Figura 1), pero las especies que se encontraron en todos los niveles y en mayor abundancia fueron *Nothofagus dombeyi* y especies de Mirtáceas.

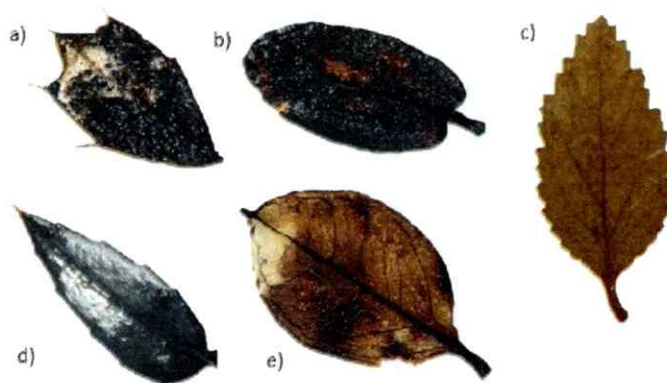


Figura 1. Hojas subfósiles extraídas desde el yacimiento Caunahue, a) *Berberis darwinii*; b) *Eucryphia cordifolia*. c) *Nothofagus dombeyi*; d) *Gaultheria mucronata* e) *Amomyrtus sp*.

Tabla 1. Edad calendario de los niveles de los cuales se extrajeron hojas

Profundidad (cm)	Nivel	Número del laboratorio	¹⁴ C BP	±	Años Calendario	±
1550	BmovN3	6484	4460	30	4999	101
1198	BmovN2	6483	4590	30	5162	72.5
967	1133-1166	6481	5960	30	6738	71
282	Bmov8	6477	11330	40	13176	92
250	Bmov7	6476	11490	40	13341	89
210	Bmov6	6475	11940	40	13767	47
130	Bmov4	6474	12450	40	14585	342
94	Bmov3	6473	12590	40	14954	216
80	Bmov2	6472	12510	40	14777	340
59	Bmov1	6471	12990	40	15537	209



Análogo moderno: Se recolectaron muestras de *Nothofagus dombeyi* desde localidades que se encuentran en un gradiente latitudinal en la cordillera de los Andes (Vilches: 35° 36'31"S; 71°04'0.8"O, 1197msnm; Laguna Laja: 37°23'38.04"S; 71°24'13.68"O, 1236 msnm; Caunahue: 40° 5'28"S; 72° 5'28"O, 541msnm) (Figura 2). Además, se añadió una localidad ubicada en la cordillera de la Costa (Cordillera de Nahuelbuta: 37°49'30.36"S; 73° 2'1.32"O, 1197msnm). Todo el material fue herborizado, digitalizado e ingresado al data set del laboratorio de Paleoecología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

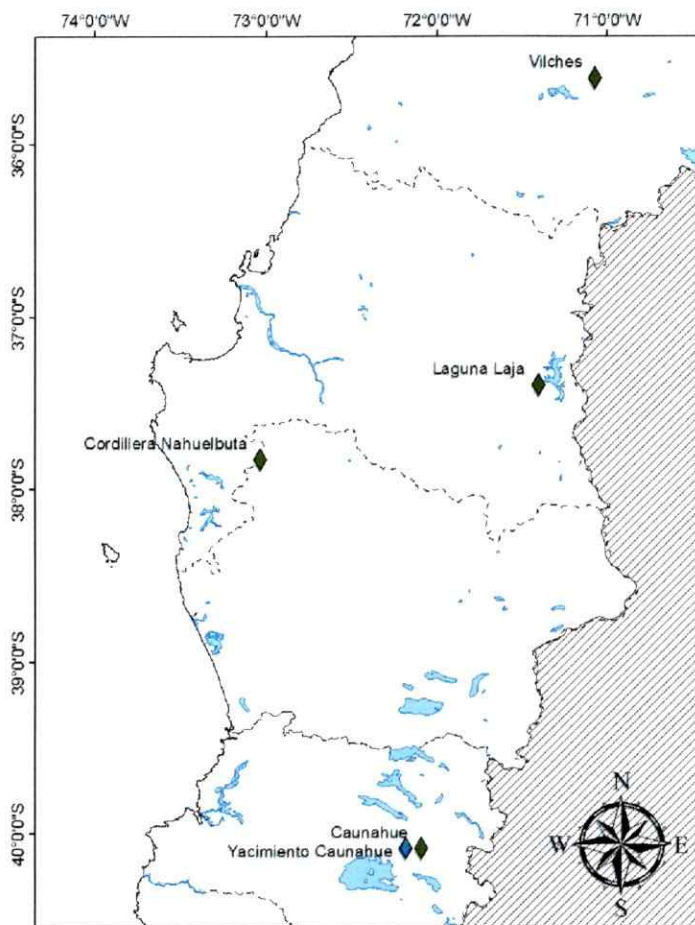


Figura 2. Mapa de las localidades donde se obtuvieron las muestras para construir el análogo moderno (♦) y el yacimiento de hojas subfósiles (◆)

2.2 Clima

Pasado

Con el fin de evaluar si es que la variación de los rasgos se corresponde con la variación temporal del clima, se utilizaron estimaciones de temperatura media anual (TMA) provenientes de dos evidencias independientes. La primera proviene de análisis sobre el continente, mientras que la segunda de análisis de temperatura a un nivel marino.

La estimación continental se realizó mediante el análisis de Correspondencia Canónica basado en la presencia/ausencia de especies leñosas en 31 localidades de Chile (Dataset en Hinojosa y col, 2011), donde se ingresaron como variables mudas las especies encontradas en cada nivel del yacimiento Caunahue para estimar la TMA. (Hinojosa, datos no publicados). La estimación marina corresponde a la TMA de la superficie del mar a los 41° de latitud sur, en la costa de Chile, obtenida mediante el índice de insaturación de alquenona (Kaiser y col., 2005). En la figura 3, se observan las curvas de TMA de ambas estimaciones para la última terminación glacial (15.5 - 13 mil años) y del Holoceno medio (6.7 -5 mil años) donde ambas estimaciones indican que este último período fue más cálido. No se encontraron estimaciones para la precipitación media anual (PMA) por lo que sólo se correlacionaron los rasgos de las hojas subfósiles con la TMA.

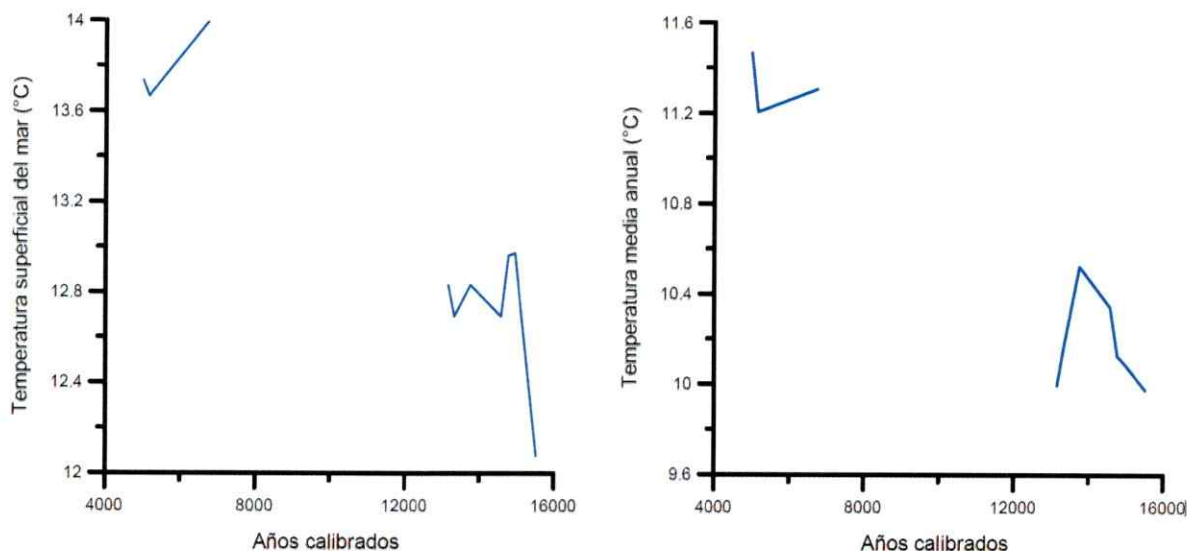


Figura 3. Curvas de temperatura media anual de la estimación continental y la marina para los períodos entre los 15.5 - 13 y 6.7 - 5 mil años (Hinojosa, datos no publicados; Kaiser y col, 2005)

Análogo moderno, variables climáticas

Los valores de TMA y PMA de los sectores con los que se construyó el análogo moderno se obtuvieron de las estaciones meteorológicas más cercanas a los lugares donde se recolectaron las muestras (Lubert & Plissock, 2006) (Tabla 2).

Tabla 2. Temperatura media anual (TMA) y precipitación media anual (PMA) de la estación meteorológica más cercana a cada lugar (Lubert & Plissock, 2006)

Lugar	Estación meteorológica	TMA (°C)	PMA (mm)
Vilches	Colorado	13.7	1380
Cordillera Nahuelbuta	Angol	13.3	1055
Laguna Laja	Laguna laja	6.8	2012
Caunahue	Futrono	13.9	1641

2.3 Preparación de las muestras

Hojas subfósiles

Se seleccionaron de forma azarosa 30 hojas subfósiles de *N. dombeyi* de cada nivel (n=300) y se utilizó la clave propuesta por Troncoso y Gutierrez (1990) para corroborar que las hojas pertenecen a la especie *N. dombeyi*. Las hojas fueron digitalizadas con una cámara SONY Exmor R 16.2 y luego con el software Photoshop Cs4 se generó un archivo JPG de la lámina foliar sin pecíolo y otro archivo JPG de la lámina sin dientes (Anexo II)

Hojas herborizadas para el análogo moderno

De las 4 localidades para construir el análogo moderno se obtuvo un total de 26 individuos de *Nothofagus dombeyi* (Vilches = 7, Cordillera Nahuelbuta = 6, Laguna Laja = 6 y Caunahue = 7). De cada individuo se extrajeron 3 hojas las cuales fueron digitalizadas con el mismo procedimiento descrito para las hojas subfósiles.

Hojarasca actual de la ribera del río Caunahue

Con el fin de visualizar los rasgos que difieren por efecto tafonómico, entre muestras de hojarasca actual y muestras de herbario de una misma localidad bajo las mismas condiciones climáticas, se seleccionaron al azar 30 hojas actuales que se encontraban en la orilla del río Caunahue las cuales fueron digitalizadas con el mismo procedimiento descrito anteriormente. Cabe destacar que para realizar con mayor precisión esta comparación se debe hacer con hojas actuales del fondo del lago

Ranco, pero como no se tiene este tipo de muestra, se cree que de igual forma es posible identificar los rasgos foliares que son sensibles al efecto tafonómico en el trayecto desde el dosel a la orilla del río y por ende las hojas depositadas en la ribera del río y en el fondo del lago debieran tener valores similares para los rasgos fisionómicos (Spicer, 1981).

2.4 Análisis foliar digital

Con el objetivo de medir la fisionomía foliar de *N. dombeyi*, se midieron 21 rasgos foliares cuantitativos de acuerdo a la metodología propuesta por Huff y col, (2003) y Royer y col, (2005) (Tabla 3), el detalle de cada rasgo se puede ver en la tabla del Anexo III. Dado que el rasgo número de dientes primarios (nDP) fue uno de los más relevantes, se explicará a continuación el criterio para diferenciar entre los dientes primarios y secundarios: los dientes primarios son dientes que presentan senos con igual incisión y se asocian a venas de mayor tamaño, pero como en la especie *N. dombeyi* el grado de incisión no permite diferenciar entre los tipos de dientes, se consideró principalmente el tamaño de la vena a la que se asocia el diente para diferenciar entre dientes primarios y secundarios. Luego de tener las imágenes digitalizadas se utilizó el software *imageJ* para realizar las mediciones.

Tabla 3. Lista de los 21 rasgos foliares medidos y su abreviatura

	Rasgo	Abreviatura		Rasgo	Abreviatura
1	Área de lámina	area	12	Área de dientes	areadientes
2	Área lámina interna	areainterna	13	Área de dientes/Área de lámina	AD:AL
3	Perímetro total	Ptotal	14	Área de dientes/Perímetro total	AD:P
4	Perímetro interno (sin dientes)	Pinterno	15	Área de dientes /Perímetro inteno	AD:PI
5	Largo eje longitudinal	eje long	16	Número de dientes primarios	nDP
6	Largo eje transversal	eje trans	17	Número de dientes secundarios	nDS
7	Relación Ptotal/Pinterno	P:PI	18	Número de dientes total	dientesTOTAL
8	Compacidad	compacidad	19	Promedio de área de dientes	AD:nDP
9	Factor de forma	fforma	20	Número de dientes/perímetro total	nDT:P
10	Diámetro Feret	feret	21	Número de dientes/perímetro interno	nDT:PI
11	Relación Feret	rferet			

2.5 Análisis estadísticos:

Análisis de componentes principales (ACP)

Este análisis se realizó con un fin exploratorio para seleccionar los rasgos que explicaban la mayor varianza entre los niveles de las hojas subfósiles y las localidades del análogo moderno. En este análisis se utilizó el valor promedio de cada rasgo, para cada nivel y cada localidad del análogo moderno (Anexo IV). Se seleccionaron aquellos rasgos que presentaron una correlación mayor o igual a un 70% con el componente principal 1 y 2. Para este análisis se utilizó el software Canoco versión 4.54 for Windows (Ter Braak y col, 2002).

Análisis de correlación de Pearson

Los rasgos seleccionados desde el ACP para las hojas subfósiles, fueron correlacionados con los valores de temperatura media anual obtenida de las estimaciones continentales y marinas (Hinojosa datos no publicados; Kaiser y col, 2005). Los rasgos de las hojas pertenecientes al análogo moderno fueron correlacionados con la temperatura media anual y la precipitación media anual obtenida de las estaciones meteorológicas (Lubert & Plissock, 2006). En este análisis se utilizaron los promedios de los rasgos para cada nivel y localidad del análogo moderno. Para este análisis se utilizó el software R (R Core Team, 2012).

Análisis de regresión lineal simple

Para determinar la significancia y dirección de la relación se realizó una regresión lineal simple a los rasgos que se correlacionaron significativamente con las variables climáticas, tanto para las hojas fósiles y actuales. Para este análisis se utilizaron los promedios de cada rasgo y se utilizó el software R para realizar el análisis.

Test de T para dos muestras con permutaciones

Para determinar si existen diferencias de los rasgos significativos entre las muestras de hojarasca actual y las muestras de herbario, ambas pertenecientes a la localidad de Caunahue, se realizó un test de T con 999 permutaciones para ampliar el número de la muestra y se utilizaron todos los datos de ambas muestras. Para este test se empleó el software PAST versión 2.17c (Hammér y col, 2001)



3. Resultados

3.1 Hojas subfósiles del yacimiento Caunahue

Análisis de componentes principales

Mediante el análisis de componentes principales (Figura 4), se determinó que 14 de los 21 rasgos foliares son los que producen la mayor separación entre las hojas de los distintos años. El componente principal 1 contiene el 44 % de la variación de los grupos, donde los rasgos que tienen una mayor correlación con este eje son: área de lámina, área de lámina interna, perímetro lámina total, perímetro lámina interna, eje longitudinal, eje transversal, diámetro de Feret, área de dientes, número de dientes totales y número de dientes primarios (nDP). El componente principal 2 contienen el 22 % de la varianza donde los rasgos que mayor correlación tienen con este eje son las relaciones: área de dientes /área de lámina (AD:AL), área dientes / perímetro lámina total (AD:P), área dientes / perímetro lámina interno (AD:PI) y área de dientes /número dientes primarios(AD:nDP) (Tabla 4).

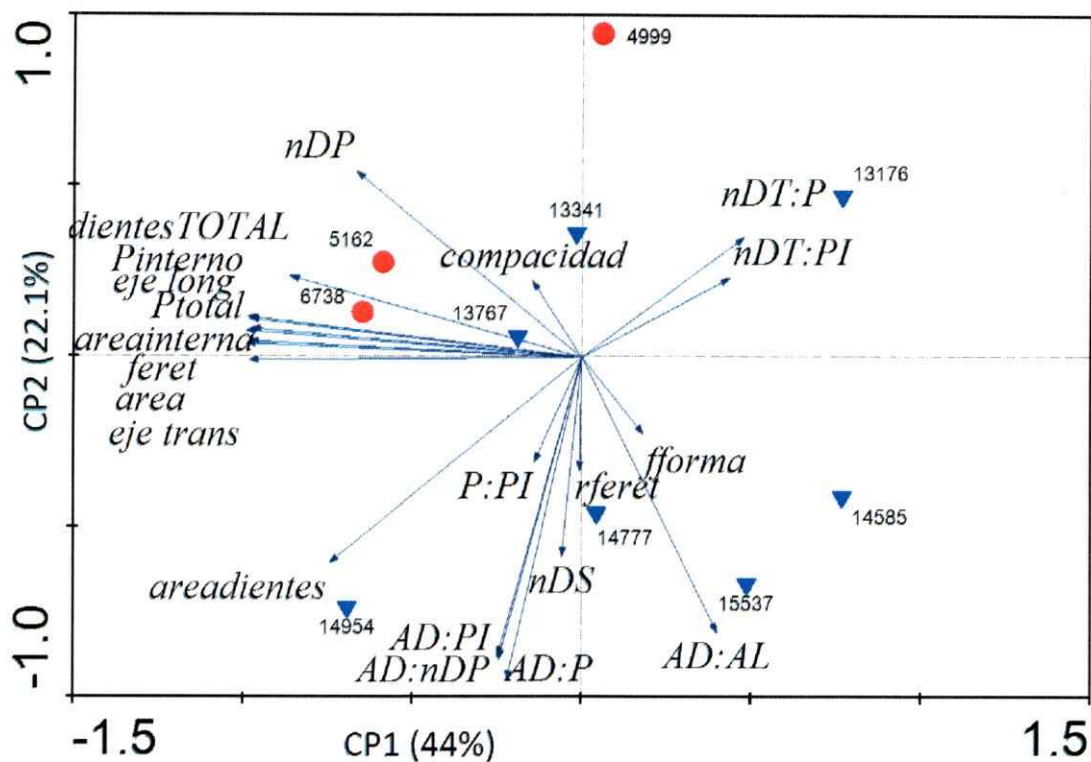


Figura 4. Ordenación de las hojas subfósiles mediante el análisis de componentes principales de acuerdo a los 21 rasgos foliares. ▼ Hojas correspondientes al período de la última termino glacial. ● Hojas correspondientes al período del Holoceno medio. Los números corresponden a los años calendario de hojas subfósiles y las abreviaturas corresponden a los rasgos foliares medidos.

Tabla 4. Rasgos con mayores valores de correlación para cada componente principal (CP)

CP1	Correlación	CP2	Correlación
Diámetro de feret	-0.99	AD:nDP	-0.95
Perímetro total	-0.99	AD:P	-0.89
Perímetro interno	-0.99	AD:P I	-0.88
Área lámina	-0.98	AD:A L	-0.81
Eje transversal	-0.98		
Eje longitudinal	-0.98		
Área interna	-0.98		
Dientes Total	-0.86		
Área dientes	-0.75		
nDP	-0.67		

Correlaciones de los rasgos seleccionados mediante ACP con estimaciones térmicas para los dos períodos.

Los rasgos AD:AL y nDP fueron los que presentaron una correlación significativa con las dos estimaciones térmicas (tabla 5). El rasgo AD:AL se correlacionó negativamente con la temperatura media anual, por el contrario nDP se correlacionó positivamente con la temperatura media anual. Estos resultados indican que las hojas pertenecientes a la última terminación glacial tendrían un menor nDP y mayor área de dientes relativo al área total, en comparación con las hojas del Holoceno medio.

Tabla 5. Correlación de los rasgos foliares con las dos estimaciones térmicas. Los rasgos en **negrita** fueron significativos.

Rasgos	Temperatura marina 41 ° latitud sur		Temperatura continental 40° latitud sur	
	r	valor p	r	valor p
nDP	0.82	0.003	0.70	0.020
AD:AL	-0.67	0.034	-0.69	0.020
Área interna	0.70	0.021	0.59	0.070
Área lámina	0.69	0.026	0.56	0.080
Perímetro interno	0.66	0.036	0.56	0.089
Diámetro Feret	0.65	0.040	0.53	0.100
Dientes totales	0.64	0.040	0.62	0.053
Eje longitudinal	0.64	0.045	0.55	0.090
Perímetro total	0.62	0.050	0.50	0.130
Eje transversal	0.62	0.053	0.48	0.150
AD:nDP	-0.44	0.190	-0.47	0.170
AD:PI	-0.30	0.390	-0.41	0.230
AD:P	0.82	0.420	-0.38	0.270
Área dientes	0.16	0.640	0.01	0.980

Regresión lineal de los rasgos área dientes / área lámina (AD:AL) y número dientes primarios (nDP), con las estimaciones térmicas.

Área dientes / Área de lámina

La regresión lineal muestra la relación negativa del rasgo AD:AL con las dos estimaciones de la temperatura media anual, donde el modelo lineal para la estimación a los 40° latitud sur ($r^2 = 0.47$, valor $p=0.020$) tiene un mejor ajuste que para la estimación a los 41° latitud sur ($r^2 = 0.44$, valor $p=0.034$) (Figura 5).

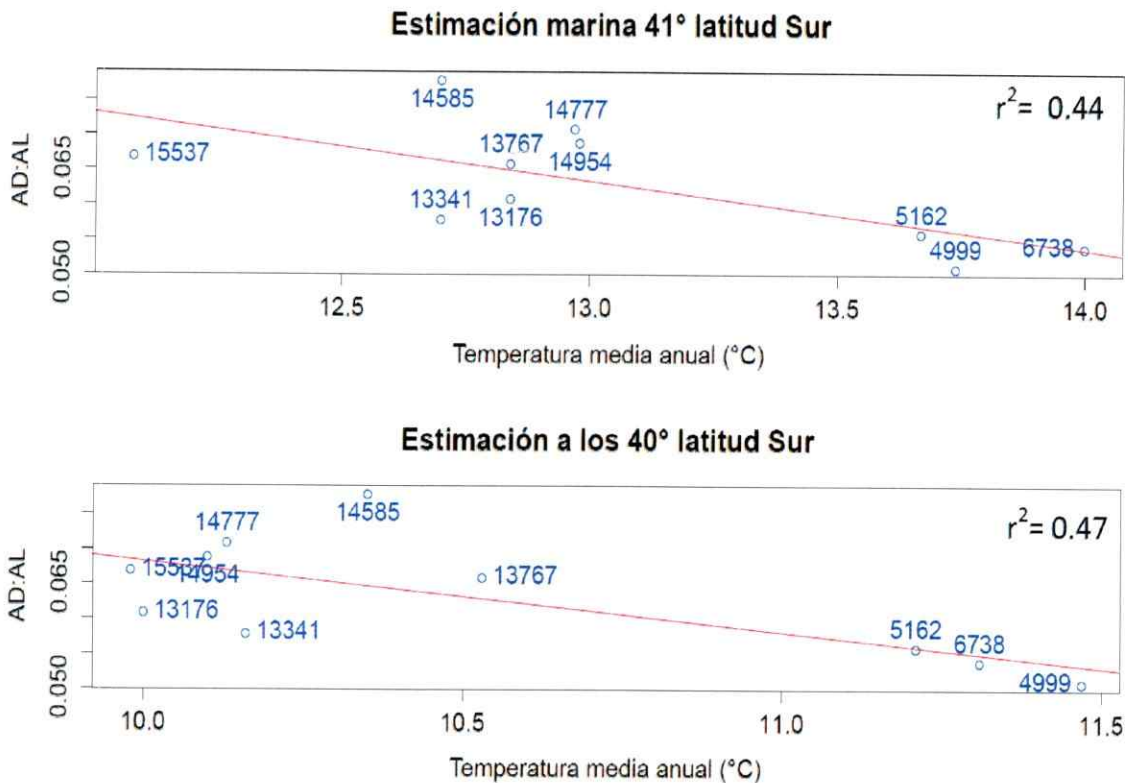


Figura 5. Regresión lineal del rasgo AD:AL con las dos estimaciones de la temperatura media anual. En la esquina derecha superior se encuentra el valor del coeficiente de determinación (r^2).

Número de dientes primarios

La regresión lineal muestra la relación positiva de nDP con las dos estimaciones de la temperatura media anual, donde el modelo lineal tiene un mejor ajuste para la estimación marina ($r^2 = 0.68$, valor $p=0.003$) en comparación con la estimación continental ($r^2 = 0.48$, valor $p=0.020$) (Figura 6)

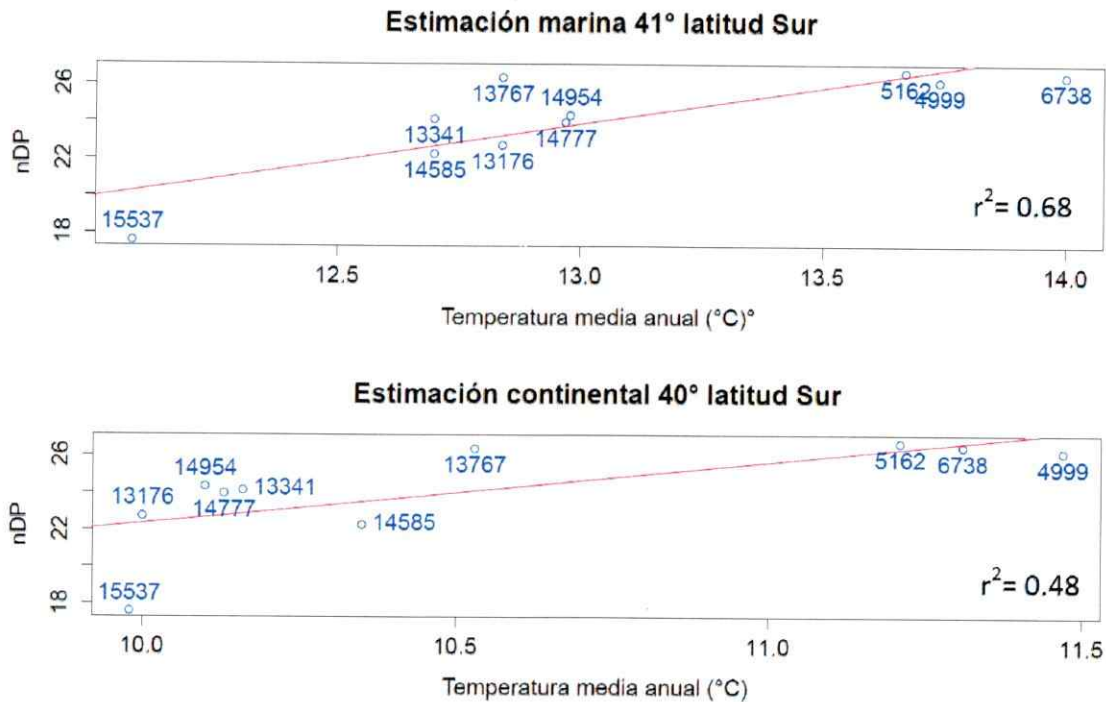


Figura 6. Regresión lineal del nDP con las dos estimaciones de temperatura media anual. En la esquina derecha inferior se encuentra el valor del coeficiente de determinación (r^2).

3.2 Hojas actuales en un gradiente latitudinal

Análisis de componentes principales

De acuerdo al análisis de componentes principales (Figura 7), se seleccionaron 15 de los 21 rasgos foliares, los que generarían la mayor variación entre las hojas. El componente principal 1 contiene el 64.1% de la varianza, donde los rasgos que tiene mayor correlación con este eje son: área de dientes, perímetro total, AD:nDP, AD: P, eje transversal, eje longitudinal, diámetro de Feret, área de lámina, área lámina interna, perímetro interno, AD:PI, nDP. El componente principal 2 contiene el 27.1 % de la varianza y los rasgos que tienen una mayor correlación con este eje son: nDS, relación de Feret, nDT / PI (Tabla 6).

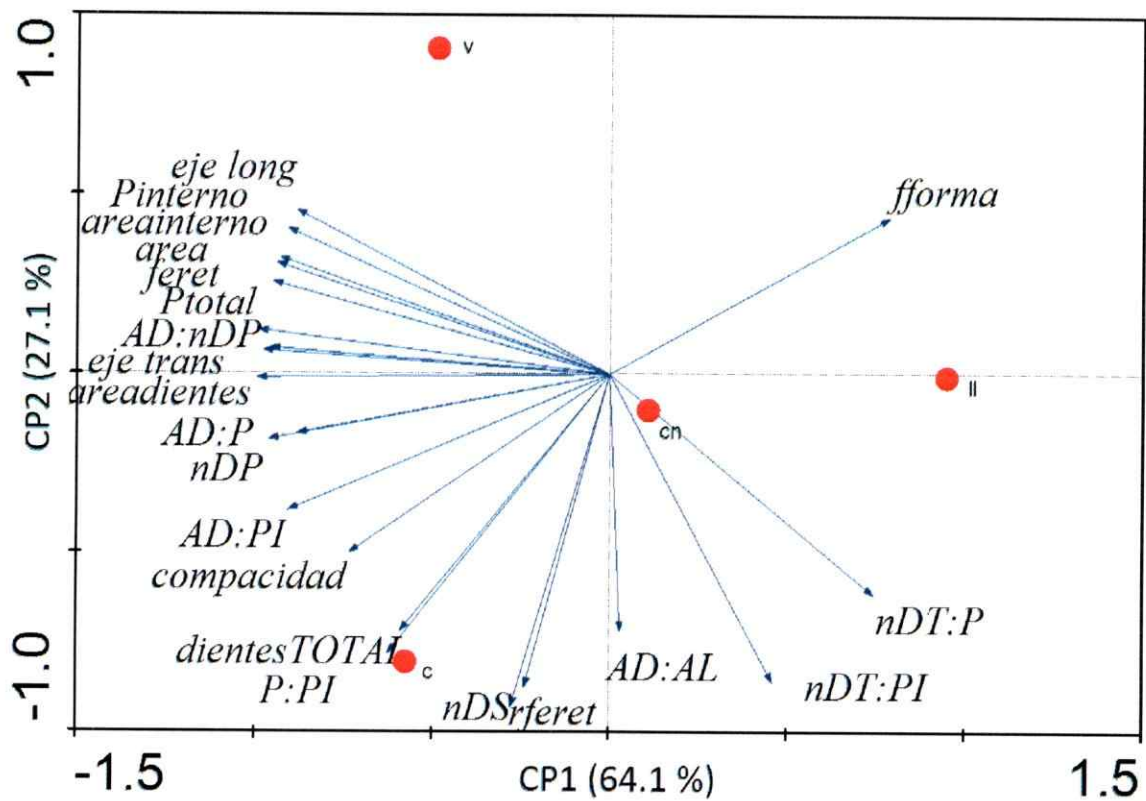


Figura 7. Ordenación de las hojas actuales de cada localidad mediante el análisis de componentes principales de acuerdo a los 21 rasgos foliares. ● Localidades donde se obtuvieron las hojas: Vilches (v), Cordillera de Nahuelbuta (cn), Laguna Laja (ll) y Caunahue (c). Las abreviaturas corresponden a los rasgos foliares.

Tabla 6 . Rasgos con mayores valores de correlación para cada componente principal (CP)

CP 1	Correlación	CP 2	Correlación
Área dientes	-0.99	nDS	-0.92
Perímetro total	-0.99	Relación feret	-0.87
AD:nDP	-0.97	nDT: PI	-0.85
AD:P	-0.96		
Eje transversal	-0.95		
Diámetro feret	-0.95		
Área lámina	-0.94		
Área interna	-0.93		
Perímetro interno	-0.91		
AD:P I	-0.90		
Eje longitudinal	-0.88		
nDP	-0.88		

Correlaciones de los rasgos seleccionados mediante al análisis de componentes principales con la temperatura media anual y la precipitación media anual.

Los rasgos eje transversal y nDP fueron los únicos que se correlacionaron significativamente con la temperatura media anual. El eje transversal se correlacionó positivamente con la temperatura ($r = 0.99$, valor $p=0.008$), al igual que el nDP ($r= 0.98$, valor $p=0.016$) (Tabla 7).

Ninguno de los rasgos presentó una correlación significativa con la precipitación media anual, ni tuvieron un valor p cercano a 0.05. De acuerdo a estos resultados las hojas pertenecientes a las localidades con mayores temperaturas medias presentan valores del nDP y del largo del eje transversal superiores a las hojas de los lugares con menor temperatura media anual.

Tabla 7. Correlación de los rasgos foliares con la temperatura media anual y la precipitación media anual obtenida desde las estaciones meteorológicas.

Rasgos	Temperatura media anual		Precipitación media anual	
	r	valor p	r	valor p
Eje transversal	0.99	0.008	-0.71	0.280
Número dientes primarios	0.98	0.016	-0.76	0.230
Diámetro de Feret	0.94	0.056	-0.65	0.340
Perímetro total	0.93	0.060	-0.53	0.460
Área lámina	0.92	0.070	-0.63	0.360
Área lamina interna	0.91	0.080	-0.64	0.350
Perímetro interno	0.86	0.130	-0.58	0.410
Área dientes	0.89	0.140	-0.41	0.580
eje longitudinal	0.84	0.150	-0.58	0.411
AD:nDP	0.83	0.160	-0.32	0.670
AD:P	0.82	0.170	-0.26	0.730
AD:PI	0.77	0.220	-0.20	0.700
Relación de Feret	0.38	0.600	0.28	0.700
nDS	0.35	0.640	-0.14	0.850
nDT:PI	-0.34	0.650	0.22	0.770

Regresión lineal de los rasgos eje transversal y número de dientes primarios.

Largo de eje transversal

La regresión lineal muestra una asociación positiva entre el largo del eje transversal y la temperatura media anual donde el modelo lineal explica el 97% de la varianza (Figura 8).

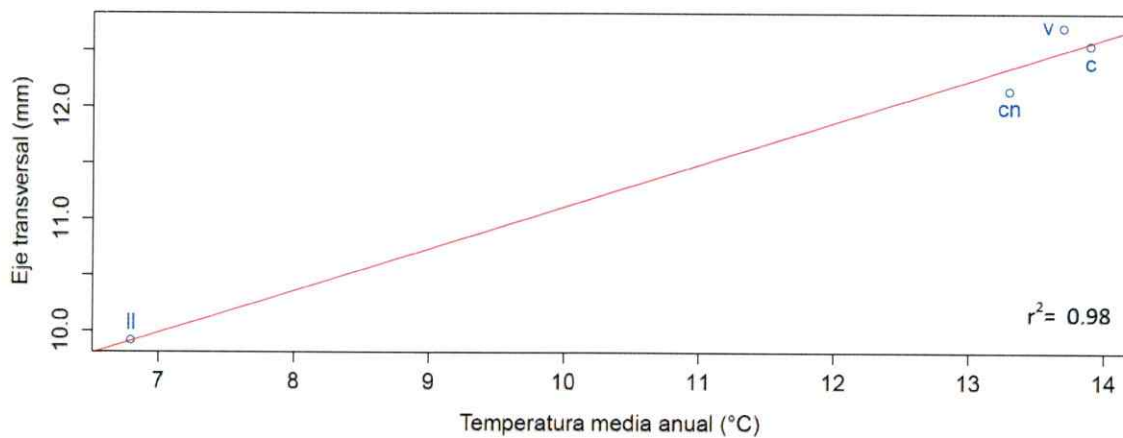


Figura 8. Regresión lineal del largo del eje transversal con la temperatura media anual. En la esquina derecha inferior se encuentra el valor del coeficiente de determinación (r^2). Vilches (v), Cordillera de Nahuelbuta (cn), Laguna Laja (ll) y Caunahue (c).

Número de dientes primarios

La regresión lineal muestra una asociación positiva entre el nDP y la temperatura media anual, donde el modelo lineal explica el 95% de la varianza (Figura 9).

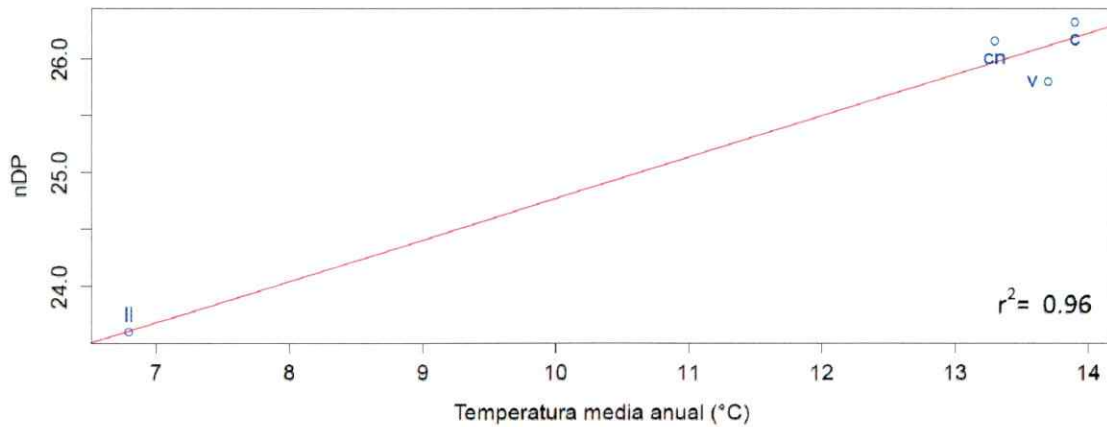


Figura 9. Regresión lineal del largo del nDP con la temperatura media anual. En la esquina derecha inferior se encuentra el valor del coeficiente de determinación (r^2). Vilches (v), Cordillera de Nahuelbuta (cn), Laguna Laja (ll) y Caunahue (c).



3.3 Comparación de rasgos significativos entre hojas actuales obtenidas de la hojarasca y de herbarios pertenecientes al sector de Caunahue

Las comparaciones para dos muestras con el test t-student con permutaciones (Tabla 8), indican que el rasgo largo de eje transversal es significativamente menor entre las muestras de hojarasca y herbario del río Caunahue, mientras que los rasgos AD: AL y nDP no presenta diferencias entre estos dos tipos de muestras, por lo que habría un efecto tafonómico sólo para el largo del eje transversal.

Tabla 8. Promedios y test de t con permutaciones, de los rasgos nDP, largo de eje transversal y AD: AL, de muestras actuales de hojarasca y herbario recolectadas en Caunahue.

	Hojarasca	Herbario			
	Promedio		F	t- test	valor p
Eje transversal	10.8	12.5	0.7	2.9	0.004
AD:AL	0.06	0.05	0.01	-1.16	0.24
nDP	27.4	26.33	0.7	-1.2	0.25

4. Discusión

4.1 Temperatura como modulador de los cambios fisionómicos de *N. dombeyi*

Los resultados obtenidos apoyan a modo general las hipótesis planteadas para *N. dombeyi*, ya que muestran que existe una asociación entre la fisionomía foliar y la temperatura media anual, pero no entre la fisionomía foliar y las precipitaciones, tanto para las muestras actuales de herbario como para las subfósiles. Con respecto al pasado, las hojas subfósiles de *N. dombeyi* pertenecientes al yacimiento Caunahue presentaron cambios en su fisionomía entre la última terminación glacial y el Holoceno medio, donde el clima fue más frío para el primer período en relación al segundo (Vargas- Ramirez y col, 2008; Moreno, 2004; Kayser y col, 2005; Hinojosa datos no publicados). Las hojas actuales también presentan variaciones morfológicas entre las poblaciones que habitan en sectores con distinta temperatura media anual.

Las precipitaciones no influyen la fisionomía foliar de *N. dombeyi*, porque en las hojas actuales ningún rasgo se correlaciona significativamente con la precipitación media anual. Sin embargo, se sabe que en bosques tropicales esta variable cobra mayor importancia en la modulación del área y ancho foliar cuando las precipitaciones son menores a 1000mm (Givnish 1984). En sectores donde la PMA está sobre los 1000mm, las hojas no incrementan significativamente su área o ancho a medida que aumenta la precipitación anual. Suponiendo que esto también ocurre en los bosques templados de Sur América, es posible que la precipitación no haya influenciado la fisionomía foliar dado que tanto las hojas subfósiles como actuales se encuentran en ambientes donde las precipitaciones anuales superaban los 1000mm anuales (Villagrán, 1985; Lubert & Pliscoff 2006)

4.2 Rasgos que cambian con la temperatura en *N. dombeyi*

Los resultados para el rasgo nDP apoyan la hipótesis II, en relación a la coherencia esperada entre el registro fósil y el análogo moderno, ya que al comparar los rasgos que se correlacionan significativamente con la temperatura media anual para las hojas subfósiles y las hojas actuales, se observa que el rasgo nDP fue significativo para ambas muestras, aunque esto no ocurrió para el resto de los rasgos analizados.

La relación AD:AL sólo se correlaciona significativamente en el registro fósil, y el ancho del eje transversal es significativo sólo para el registro actual. El hecho de que la asociación entre el rasgo eje transversal y la temperatura media anual sea significativa en las muestras actuales y no en las subfósiles, puede deberse a un efecto tafonómico, ya que las hojas de menor tamaño llegan en mejores condiciones al fondo del lago, dado que la turbulencia del río fragmenta las hojas más grandes (Spicer 1981). El rasgo largo transversal es diferente entre muestras actuales de hojarasca y herbario pertenecientes al sector de Caunahue, encontrándose una mayor cantidad de hojas con menores valores del largo de eje transversal en la hojarasca. Debido a lo anterior, las mediciones de las hojas provenientes del herbario no están sesgadas en cuanto a su tamaño, lo que permite distinguir diferencias entre las hojas de las distintas poblaciones, mientras que en los sedimentos del Caunahue se encontrarían representadas sólo las hojas de menor tamaño lo que no permite distinguir si es que existieron diferencias en el tamaño del eje transversal entre estos dos períodos pasados.

Para los rasgos AD:AL y nDP no se encontraron diferencias entre las muestras de hojarasca de la ribera del Caunahue y las muestras de herbario, por lo que se puede descartar el efecto tafonómico para estos rasgos, es decir la variación de estos rasgos no depende de la procedencia de la muestra. Sin embargo AD:AL no se correlaciona con la temperatura media anual en las muestras de herbario, pero sí en las muestras de hojarasca fósil. Es posible que el número de sectores estudiados no sea suficiente para evaluar estadísticamente este problema y sea necesario añadir un mayor número de sectores al análogo moderno, para verificar si esta falta de asociación se debe a un tamaño de muestra insuficiente o a que efectivamente las diferencias térmicas entre los dos períodos, en Caunahue, fueron mayores a las estimaciones térmicas utilizadas en este estudio.

La causa de que a mayores temperaturas las hojas presenten un aumento en el nDP no se puede determinar en este estudio, sin embargo se ha demostrado que en algunas especies de los géneros *Acer*, *Quercus*, entre otros, hay una mayor tasa de fotosíntesis en los dientes de las hojas con respecto al resto de la lámina (Baker-Brosh & Peet, 1997; Royer & Wilf, 2006), por lo que una mayor cantidad de dientes primarios permitiría aumentar la tasa de fotosíntesis en el período de crecimiento en zonas templadas. Este era el resultado esperado para *N. dombeyi*, según la hipótesis I. Sin embargo, los resultados de este estudio no se condicen con lo descrito en la literatura, donde se esperaba encontrar mayor nDP en los ambientes más fríos (Huff y col, 2003; Royer y col, 2005; Peppe y col, 2011). No obstante, para *N. dombeyi* se encontró una asociación positiva entre estas variables, es decir *N. dombeyi* presenta mayor nDP en climas relativamente más cálidos.

Dado que la definición de dientes primarios se asocia a la presencia de venas foliares de mayor diámetro (Manual of Leaf Architecture, 1999), en comparación con los dientes secundarios esto implica que las hojas con un mayor nDP presentan más vías para la conducción de fotosintatos y superiores tasas de transpiración. De hecho las hojas que se encuentran expuestas al sol tienen mayor densidad de venación foliar y por ende presentan mayores tasas de transpiración y fotosíntesis (Wylie, 1951), lo que podría estar directamente relacionado con un mayor número de dientes primarios. Esta relación permitiría explicar el hecho que encontremos en el área de estudio hojas con un mayor número de dientes primarios en zonas más cálidas con alta humedad. Sin embargo, aún falta determinar si es que realmente las hojas de *N. dombeyi* tienen alta densidad de venas en las localidades más cálidas.

En relación a la magnitud de la variaciones fisonómicas en *N. dombeyi*, es evidente que estas no son apreciables a simple vista, ya que son diferencias milimétricas en el caso del largo transversal (figura 8) y de sólo dos dientes primarios entre los lugares con las menores y mayores temperaturas (figura 9). Estos hechos despiertan nuevas interrogantes respecto a si cambios de esta magnitud influyen significativamente en la eficiencia fotosintética de esta especie y si es posible discriminar una inercia filogenética (contexto histórico) por sobre el efecto del clima (contexto ecológico) en la modulación de estos rasgos.

Con respecto a la utilización de esta especie como estimador de temperaturas de la última terminación glacial, un modelo basado sólo en rasgos foliares de *N. dombeyi* no sería preciso, ya que la magnitud de las variaciones foliares son sutiles, siendo los estudios interespecíficos más precisos en las estimaciones. Sin embargo, el estudio de las variaciones fisonómicas intraespecíficas permitiría identificar las

especies con mayor plasticidad a las variables climáticas. La importancia de este estudio radica en que se evidencia que no todos los rasgos foliares son influenciados de la misma manera por los factores ambientales dentro de una misma especie, y que para un mismo rasgo diferentes especies pueden responder de forma particular ante cambios climáticos.

4.3 ¿Plasticidad fenotípica o diferencia genotípica?

Los datos obtenidos en este trabajo, no permiten determinar si las diferencias fisionómicas observadas se deben a, plasticidad fenotípica de *N. dombeyi*, o a diferencias genéticas. Para resolver este problema se requieren estudios de jardín común. Sin embargo, existe evidencia en la especie *Acer rubrum*, donde se explora la influencia relativa de la plasticidad fenotípica y genotípica sobre la fisionomía foliar los resultados sugieren que los rasgos asociados al nDP y disección de la hoja podrían responder rápidamente a los cambios climáticos (Royer y col, 2009), lo que sugiere que un proceso similar podría estar ocurriendo con el rasgo nDP en *N. dombeyi*.



5. Conclusiones

Los resultados de este estudio, realizado en la especie *N. dombeyi* de las localidades Vilches, Nahuelbuta, Laguna Laja, Caunahue y del yacimiento fósil Caunahue, sugieren que:

Existe una asociación entre la fisionomía foliar de la especie *N. dombeyi* y la temperatura media anual. Sin embargo, la variación de los rasgos presentó un patrón distinto a lo predicho por la literatura, encontrándose un mayor nDP (dientes asociados a venas secundarias o de diámetro superior a las venas terciarias) en lugares y épocas más cálidas.

La variación de la fisionomía foliar de *N. dombeyi* en el pasado fue parcialmente similar a la del presente, ya que el nDP mostró una variación significativa entre las hojas subfósiles y actuales, mientras que la relación AD:AL y largo del eje transversal sólo fueron significativas para las muestras subfósiles. Las razones pueden estar asociadas a efectos tafonómicos o a que las diferencias térmicas hayan sido aún mayores a las estimaciones que existen actualmente para esta zona.

6. Referencias

- Bailey, I. W., & Sinnott, E. W. 1916. The climatic distribution of certain types of angiosperm leaves. *American journal of botany*. 24-39.
- Baker-Brosh, K. F., & Peet, R. K. 1997. The ecological significance of lobed and toothed leaves in temperate forest trees. *Ecology*, **78**: 1250-1255.
- Canny, M. J. 1990. Tansley Review No. 22 What becomes of the transpiration stream?. *New Phytologist*, **114**: 341-368.
- Chaney, R. W., & Sanborn, E. I. 1933. *The Goshen flora of west central Oregon* (No. 439). Carnegie institution of Washington.
- Dilcher, D. L., Kowalski, E. A., Wiemann, M. C., Hinojosa, L. F., & Lott, T. A. 2009. A climatic and taxonomic comparison between leaf litter and standing vegetation from a Florida swamp woodland. *American Journal of Botany*, **96**: 1108-1115.
- Feild, T. S., Sage, T. L., Czerniak, C., & Iles, W. J. 2005. Hydathodal leaf teeth of *Chloranthus japonicus* (Chloranthaceae) prevent guttation-induced flooding of the mesophyll. *Plant, Cell & Environment*, **28**: 1179-1190.
- Givnish TJ 1978 Ecological aspects of plant morphology: leaf form in relation to environment. *Bibl Biotheor* **27**:83-142.
- Givnish, T. J. "Leaf and canopy adaptations in tropical forests." *Physiological ecology of plants of the wet tropics*. Springer Netherlands, 1984. 51-84.
- Greenwood, D. R., & Wing, S. L. 1995. Eocene continental climates and latitudinal temperature gradients. *Geology*, **23**: 1044-1048.
- Troncoso, A. A., & Gutierrez, J. R. 1990 Manual de identificación de especies leñosas chilenas. Universidad de Talca, 55-56.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. 2001. Past: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica* 4: 1-9. URL:< http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.html.
- Hinojosa, L. F., Armesto, J. J., & Villagrán, C. 2006. Are Chilean coastal forests pre-Pleistocene relicts? Evidence from foliar physiognomy, palaeoclimate, and phytogeography. *Journal of Biogeography*, **33**: 331-341.

- 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**: 380-390.
- Hoffmann, A. 1982. Flora silvestre de Chile, Zona Araucana. Edición 4. Fundación Claudio Gay. *Santiago*. 258 pp.
- Huff, P. M., Wilf, P., & Azumah, E. J. 2003. Digital future for paleoclimate estimation from fossil leaves? Preliminary results. *Palaeos*, **18**: 266-274.
- Jackson, S. T., & Williams, J. W. 2004. Modern analogs in Quaternary paleoecology: here today, gone yesterday, gone tomorrow?. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.*, **32**, 495-537.
- Jordan, G. J. (1997). Uncertainty in palaeoclimatic reconstructions based on leaf physiognomy. *Australian Journal of Botany*, **45**: 527-547.
- Kaiser, J., Lamy, F., & Hebbeln, D. 2005. A 70-kyr sea surface temperature record off southern Chile (Ocean Drilling Program Site 1233). *Paleoceanography*, **20**.
- Kowalski, E. A., & Dilcher, D. L. 2003. Warmer paleotemperatures for terrestrial ecosystems. *Proceedings of the National academy of Sciences*, **100**: 167-170.
- Landrum, L. R. 1988. The myrtle family (Myrtaceae) in Chile. *Proceedings of the California Academy of Sciences (USA)*.
- Lubert, F., & Pliscoff, P. 2006. Sinopsis Bioclimática y Vegetacional de Chile. Edit. Universitaria. *Santiago*, 316.
- Manual of leaf Architecture. 1999. Morphological description and categorization of dicotyledonous and net-veined monocotyledonous angiosperms by Leaf Architecture Working Group. 65p
- Moreno, P. I. 2004. Millennial-scale climate variability in northwest Patagonia over the last 15 000 yr. *Journal of Quaternary Science*. **19**: 35-47.
- Moreno, P. I., Francois, J. P., Moy, C. M., & Villa-Martínez, R. 2010. Covariability of the Southern Westerlies and atmospheric CO₂ during the Holocene. *Geology*. **38**: 727-730.
- 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**: 724-739.

Premoli, A. C. 1996. Leaf architecture of South American Nothofagus (Nothofagaceae) using traditional and new methods in morphometrics. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **121**: 25-40.

R Core Team .2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Ramírez, C., San Martín, C., Oyarzún, A., & Figueroa, H. 1997. Morpho-ecological study on the South American species of the genus Nothofagus. *Plant ecology*. **130**: 101-109.

Reichgelt, T., Kennedy, E. M., Mildenhall, D. C., Conran, J. G., Greenwood, D. R., & Lee, D. E. 2013. Quantitative palaeoclimate estimates for Early Miocene southern New Zealand: Evidence from Foulden Maar. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. **378**: 36-44.

Rodríguez, R., Matthei, O., & Quezada, M. 1983. *Flora arbórea de Chile* (Vol. 1). Universidad de Concepción.

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**: 11-18.

Royer, D. L., McElwain, J. C., Adams, J. M., & Wilf, P. 2008. Sensitivity of leaf size and shape to climate within *Acer rubrum* and *Quercus kelloggii*. *New Phytologist*. **179**: 808-817.

Royer, D. L., Meyerson, L. A., Robertson, K. M., & Adams, J. M. 2009. Phenotypic plasticity of leaf shape along a temperature gradient in *Acer rubrum*. *PLoS One*, **4**: e7653.

Royer, D. L., Wilf, P., Janesko, D. A., Kowalski, E. A., & Dilcher, D. L. 2005. Correlations of climate and plant ecology to leaf size and shape: potential proxies for the fossil record. *American Journal of Botany*, **92**: 1141-1151.

Sinnott, E. W., & Bailey, I. W. 1915. Investigations on the Phylogeny of the Angiosperms 5. Foliar Evidence as to the Ancestry and Early Climatic Environment of the Angiosperms. *American Journal of Botany*, 1-22.

Spicer, R. A. 1981. sorting and deposition of allochthonous plant material in a modern environment at Silwood Lake, Silwood Park, Berkshire, England.

Stear, D. C., Spicer, R. A., & Bamford, M. K. 2010. Is southern Africa different? An investigation of the relationship between leaf physiognomy and climate in southern African mesic vegetation. *Review of Palaeobotany and Palynology*. **162**: 607-620.

Stuvier, M. "a Reimer, PJ .1993.Radiocarbon calibration program."*Radiocarbon* 35: 215-230.

Su, T., Spicer, R. A., LIU, Y. S. C., Huang, Y. J., Xing, Y. W., Jacques, F. M., ... & Zhou, Z. K. 2013. Regional constraints on leaf physiognomy and precipitation regression models: a case study from China. *Bull. Geosci.* **88**: 595-608.

Taylor T. N., E. L. Taylor, M. Krings. 2009. *Paleobotany: The Biology and Evolution of Fossil Plants* .Academic Press, Burlington, MA, ed. 2,

Ter Braak, C. J. F., and Petr Smilauer. 2002. "Canoco for Windows version 4.5."*Biometris-Plant Research International, Wageningen*

Vargas-Ramirez, L., Roche, E., Gerrienne, P., & Hooghiemstra, H. 2008. A pollen-based record of late glacial–Holocene climatic variability in the southern lake district, Chile. *Journal of Paleolimnology*, **39**: 197-217.

Villagrán, C. 1985. Análisis palinológico de los cambios vegetacionales durante el Tardiglacial y Postglacial en Chiloé, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, **58**: 57-69.

Wiemann, M. C., Manchester, S. R., Dilcher, D. L., Hinojosa, L. F., & Wheeler, E. A. 1998. Estimation of temperature and precipitation from morphological characters of dicotyledonous leaves. *American Journal of Botany*, **85**: 1796-1802.

Wilf, P. 1997. When are leaves good thermometers? A new case for leaf margin analysis. *Paleobiology*, **23**: 373-390.

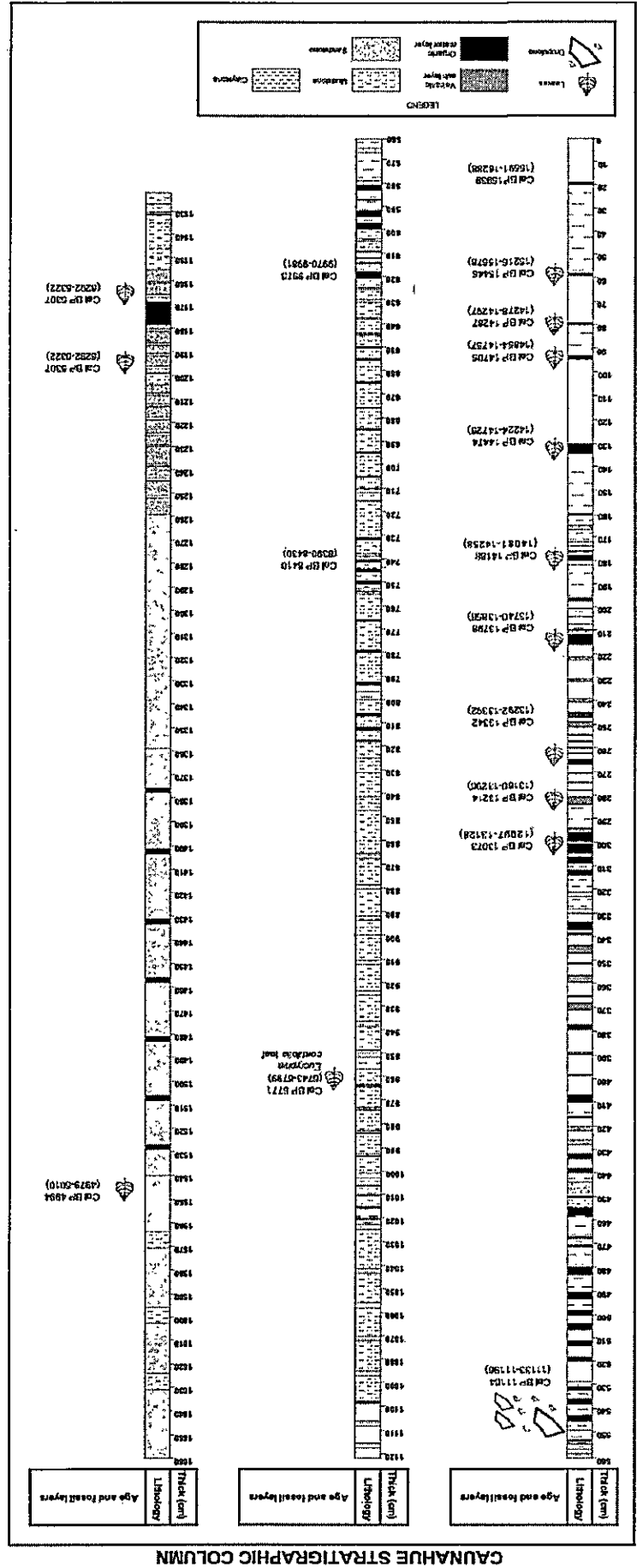
Wilf, P., Wing, S. L., Greenwood, D. R., & Greenwood, C. L.1998. Using fossil leaves as paleoprecipitation indicators: an Eocene example. *Geology*. **26**: 203-206

Wolfe, J. A. 1993. A method of obtaining climatic parameters from leaf assemblages. *US Geological Survey Bulletin*.

Wylie, R.B.1951. Principles of foliar organization shown by sun-shade leaves from ten species of deciduous dicotyledonous trees. *Am. J. Bot.* **38**: 355–361.

ANEXO I

Esquema columna estratigráfica desde donde se extrajeron las hojas utilizadas en este estudio (Gutiérrez & Hinojosa, datos no publicados)



ANEXO II

Edición digital realizada a las imágenes de las hojas de *N. dombeyi*, para realizar las mediciones de los 21 rasgos foliares. En la imagen se ejemplifica la selección el área de lámina total en la hoja del medio y luego se retiran los dientes en la hoja derecha para calcular el área de lámina interna y así calcular el área de dientes total mediante la diferencia entre el área de dientes total y el área de dientes interna.



ANEXO III

Descripción de los 21 rasgos foliares utilizados, donde se indica el tipo, abreviatura, fórmula o definición e interpretación.

	Rasgo	Tipo	Abreviatura	Unidad de medida	Definición/Fórmula	Interpretación
1	Área de lámina	Lámina	area	mm ²		
2	Área lámina interna	Lámina	areainterna	mm ²		
3	Perímetro total	Lámina	Ptotal	mm		
4	Perímetro interno (sin dientes)	Lámina	Pinterno	mm		
5	Largo eje longitudinal mm	Lámina	eje long	mm		
6	Largo eje transversal mm	Lámina	eje trans	mm		
7	Relación Ptotal/Pinterno	Lámina	P:PI	-		
8	Compacidad	Grado disección foliar	compacidad	-	$Ptotal^2/area$	a mayor valor mayor disección
9	Factor de forma	Grado disección foliar	fforma	-	$4\pi^2 area/Ptotal^2$	a menor valor mayor disección
10	Dímetro Feret	Grado disección foliar	feret	-	$\sqrt{4*area/\pi}$	
11	Relación Feret	Grado disección foliar	rferet	-	feret/eje long	1 corresponde a un círculo ; menor a 1 mayor disección
12	Área de dientes	Dientes	areadientes	mm ²		
13	Área de dientes/Área de lámina	Dientes	AD:AL	-		
14	Área de dientes/Perímetro total	Dientes	AD:P	mm		
15	Área de dientes/Perímetro interno	Dientes	AD:PI	mm		
16	Número de dientes primarios	Dientes	nDP	cuenta	*	
17	Número de dientes secundarios	Dientes	nDS	cuenta	**	
18	Número de dientes total	Dientes	dientesTOTAL	cuenta	nDP + nDS	
19	Promedio de área de dientes	Dientes	AD:nDP	mm ²	a de dientes/número de dientes primarios	
20	Número de dientes/perímetro total	Dientes	nDT:P	mm ⁻¹		
21	Número de dientes/perímetro interno	Dientes	nDT:PI	mm ⁻¹		

* Dientes con senos con igual incisión y/o asociados a venas de mayor tamaño

** Dientes con senos de desigual incisión y/o asociados a venas de menor tamaño

ANEXO IV

Promedios de los valores obtenidos para cada rasgo en el tipo de muestra subfósil, hojarasca actual y hojas herborizadas actuales.

Muestra	años/localidad	area	areainterna	Ptotal	Pinterno	PPI	compacidad	forma	eje long	eje trans	feret	rferet	areadientes	ADAL	ADP	ADPI	nDP	nDS	dientesTOTAL	ADmDP	nDfP	nDfPI
Hoja subfósil	15537	77.402	72.305	41.720	36.898	1.132	23.038	0.552	14.800	7.228	9.804	0.669	5.097	0.067	0.121	0.137	17.667	9.667	27.333	0.292	0.656	0.743
	14954	106.629	99.450	50.146	43.695	1.148	24.216	0.529	17.496	8.404	11.519	0.665	7.179	0.069	0.141	0.163	24.400	6.233	30.633	0.298	0.623	0.718
	14777	88.026	81.882	44.844	38.903	1.152	23.736	0.537	15.626	7.737	10.424	0.668	6.144	0.071	0.134	0.155	24.033	5.600	29.633	0.261	0.672	0.775
	14585	67.179	61.940	39.688	34.445	1.149	23.949	0.539	13.839	6.724	9.163	0.670	5.240	0.078	0.129	0.149	22.333	4.333	26.667	0.235	0.676	0.776
	13767	92.452	86.375	47.303	40.975	1.151	24.454	0.522	16.566	7.798	10.780	0.656	6.077	0.066	0.127	0.147	26.433	6.100	32.533	0.231	0.693	0.794
	13341	87.114	82.195	46.128	39.759	1.160	24.961	0.512	15.921	7.760	10.411	0.662	4.920	0.058	0.105	0.123	24.200	4.667	28.867	0.205	0.634	0.735
	13176	69.080	64.959	40.397	35.334	1.144	24.074	0.530	14.079	6.830	9.270	0.672	4.121	0.061	0.101	0.116	22.800	4.300	27.100	0.182	0.683	0.780
	6738	113.912	107.853	49.873	43.696	1.137	23.034	0.553	17.331	8.711	11.684	0.677	6.059	0.054	0.116	0.132	26.533	4.700	31.233	0.225	0.645	0.732
	5162	106.580	100.700	50.530	43.822	1.154	24.588	0.520	17.285	8.437	11.499	0.673	5.880	0.056	0.114	0.132	26.733	6.400	33.133	0.225	0.669	0.772
	4999	90.425	85.869	45.368	40.623	1.115	23.611	0.543	16.380	7.529	10.550	0.652	4.556	0.051	0.098	0.109	26.233	4.200	30.433	0.173	0.679	0.758
Hojarasca	Caunahue	169.665	159.568	66.995	56.372	1.191	27.364	0.467	22.699	10.852	14.534	0.643	10.097	0.060	0.148	0.177	27.400	11.867	39.267	0.370	0.590	0.704
Hojas herborizadas	Caunahue	220.926	208.397	75.049	61.633	1.217	25.992	0.490	24.360	12.561	16.632	0.686	12.529	0.057	0.165	0.201	26.333	13.190	39.524	0.478	0.530	0.646
	Cordillera Nahuelbuta	206.903	196.948	68.465	59.417	1.152	23.191	0.548	23.681	12.157	16.065	0.682	9.955	0.049	0.143	0.165	26.167	11.833	38.000	0.386	0.562	0.647
	Laguna Laja	148.595	140.907	57.849	51.571	1.121	23.247	0.550	20.657	9.929	13.537	0.661	7.688	0.054	0.133	0.149	23.611	9.944	33.556	0.333	0.576	0.646
	Vilches	249.536	237.378	76.640	67.579	1.131	24.157	0.525	27.052	12.722	17.583	0.653	12.158	0.049	0.156	0.177	25.810	8.857	34.667	0.478	0.460	0.519