



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
Biología Evolutiva

**Evaluación de la variabilidad morfológica de las hojas de *Arabidopsis thaliana* como indicador de la plasticidad fenotípica de distintos ecotipos.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**César Iván Ojeda Linares**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Mariana Benítez Keinrad**

Instituto de Ecología, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: Dra. Ma. de la Paz Sánchez Jiménez**

Instituto de Ecología, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: Dr. Mark Earl Olson Zunica**

Instituto de Biología, UNAM

**CIUDAD DE MÉXICO, Mayo, 2017.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
Biología Evolutiva

**Evaluación de la variabilidad morfológica de las hojas de *Arabidopsis thaliana* como indicador de la plasticidad fenotípica de distintos ecotipos.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**César Iván Ojeda Linares**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Mariana Benítez Keinrad**

Instituto de Ecología, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: Dra. Ma. de la Paz Sánchez Jiménez**

Instituto de Ecología, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: Dr. Mark Earl Olson Zunica**

Instituto de Biología, UNAM

**MÉXICO, D.F. Mayo, 2017.**

## **Agradecimientos Institucionales**

- Al Posgrado de Ciencias Biológicas por permitirme realizar mi proyecto de maestría, por los apoyos económicos para estancias, cursos, congresos y más.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por su apoyo económico a través de la beca de maestría.
- Al Comité Tutor: Mariana Benítez Keinrad, Dra. Ma. De la Paz Sánchez Jiménez y el Dr. Mark Earl Olson Zunica.
- A la Universidad y a los apoyos PAEP. Así como al apoyo del proyecto UNAM-DGAMA-PAPIIT (202515, 200714) y CONACyT (221341, 247672).

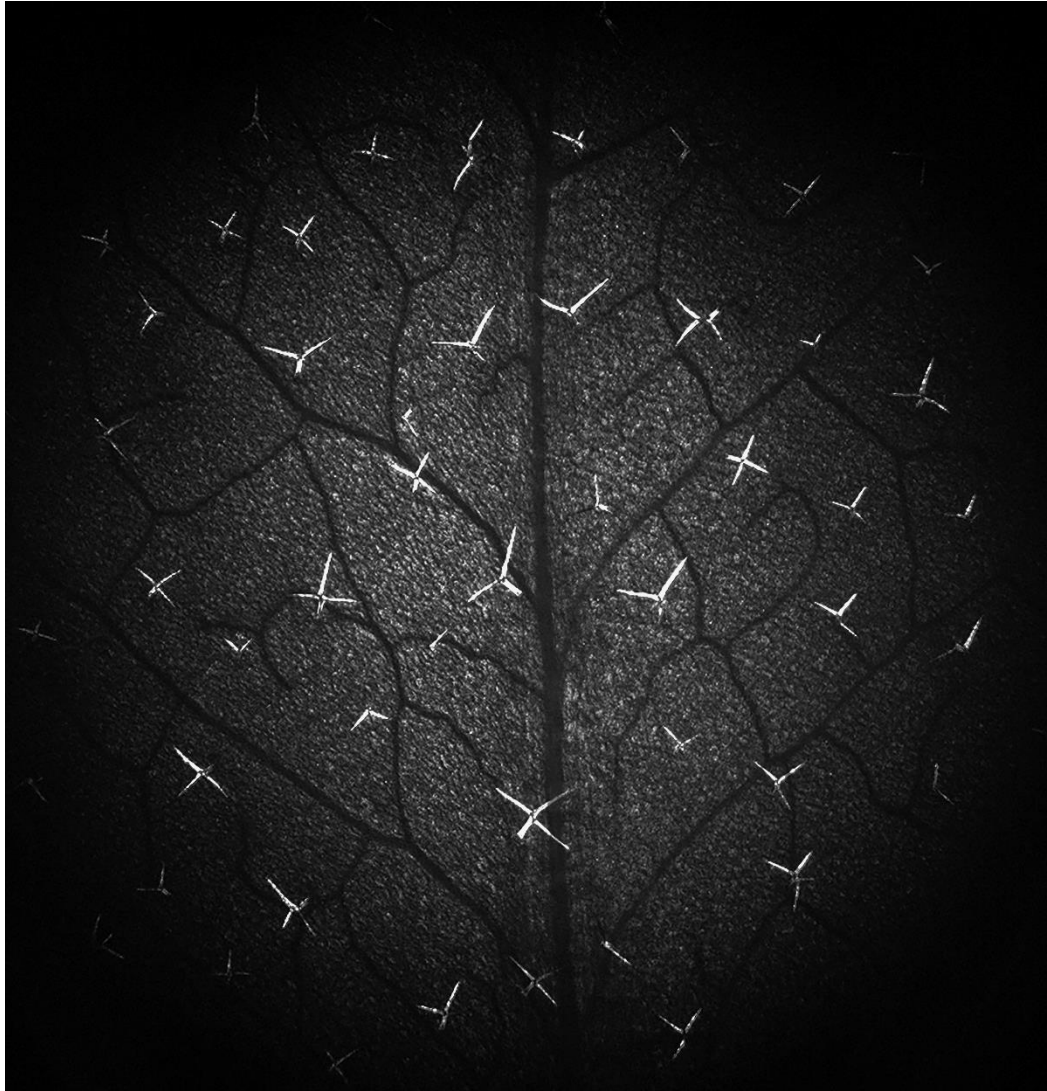
## **Supervisión durante estancia de investigación en la Universidad Kyoto Sangyo**

- Dr. Seisuke Kimura, del Kimura Lab. Universidad de Kyoto Sangyo, Laboratorio de biología del desarrollo ecológico y evolutivo de plantas. Kyoto, Japón.

## Agradecimientos personales

- A los revisores de tesis y miembros del jurado la Dra. Ma. De la Paz Sánchez Jiménez, Dra. Rocío Cruz Ortega, Mark Earl Olson Zunica, Leonardo Osvaldo Alvarado Cárdenas y Lev Orlando Jardón Barbolla por sus valiosos comentarios y sugerencias que enriquecieron enormemente este texto.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Ecología, UNAM, por todo el apoyo recibido durante mis estudios. Agradezco también a todo el personal asociado a estas instituciones que han hecho posible, de forma directa e indirecta, el avance y conclusión de este proyecto. Particularmente a Erika Rodríguez Reyes, a quien agradezco enérgicamente por su disposición y su infinita paciencia para contestar las miles de preguntas administrativas.
- Al Dr. Kimura de la Universidad de Kyoto Sangyo, por su apoyo en la enseñanza de herramientas de extracción de RNA y análisis de transcriptomas, así como por sus comentarios para mejorar algunos puntos de la presente investigación.
- Al Dr. Efraín de Luna de la Instituto Nacional de Ecología, Xalapa, al Dr. Peter Chris Klingenberg de la Universidad de Manchester, quienes contribuyeron en mi conocimiento de las herramientas de morfometría geométrica. Al laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, que está bajo la coordinación académico-científica de las Dras. Elena Alvarez-Buylla Roces, Adriana Garay Arroyo, Berenice García Ponce de León y Ma. de la Paz Sánchez Jiménez, por proporcionarme las semillas de las diferentes poblaciones de Arabidopsis y facilitarme sus instalaciones y equipos para la realización de esta investigación.
- Al Dr. Seisuke Kimura por permitirme realizar una estancia de investigación en su laboratorio. Asimismo, agradezco a los miembros del “Kimura Lab” especialmente a Kaoru por toda la paciencia y enseñanza que me ofreció. Así como a la Universidad de Kyoto Sangyo por facilitarme las instalaciones donde realicé la estancia.
- Al Laboratorio Nacional de Ciencias de la Sostenibilidad. En particular al grupo de trabajo de la Dra. Benítez.

- A mi madre Lilia Linares Gómez, porque siempre he recibido su apoyo incondicional, comprensión y cariño. Particularmente, tú siempre has sido mi ejemplo de trabajo, constancia, cariño y más en mi vida. No basta este espacio para poder agradecerte todas las cosas que hemos compartido y seguiremos compartiendo.
- A mi amigo Alfredo Martínez Arévalo y a su familia, por la amistad incondicional que me han brindado durante más de una década.
- A mí adorada Alejandra Cruz Rodríguez por darme esperanza y su paciencia durante este proyecto. Muchas gracias por todo el cariño, los detalles y tu compañía.



Fotografía titulada "***Constelación de tricomas***" ganadora del tercer lugar en el primer concurso de fotografía del centro de ciencias de la complejidad, UNAM.



## Índice

.....	1
.....	3
<b>Resumen</b> .....	10
<b>Abstract</b> .....	12
<b>1 Introducción</b> .....	14
<b>1.1 Plasticidad fenotípica</b> .....	15
<b>1.2 Normas de reacción</b> .....	16
<b>1.3 Plasticidad adaptativa</b> .....	18
<b>1.3 Plasticidad no adaptativa</b> .....	19
<b>1.4 Costos y límites de la plasticidad</b> .....	20
<b>1.5 Heterogeneidad ambiental</b> .....	21
<b>1.6 Plasticidad fenotípica en las plantas</b> .....	22
<b>1.7 Plasticidad fenotípica en <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	24
<b>2. Hipótesis y objetivos</b> .....	27
<b>2.1 Hipótesis</b> .....	27
<b>2.2 Objetivo general</b> .....	27
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	28
<b>3.1 Material vegetal</b> .....	29
<b>3.2 Caracterización ambiental</b> .....	30
<b>3.3 Diseño experimental</b> .....	31
<b>3.4 Adquisición de imágenes, medidas y tricomas</b> .....	34
<b>3.5 Protocolo de morfometría geométrica</b> .....	35
<b>3.6 Análisis estadísticos</b> .....	38
<b>4 Resultados</b> .....	40
<b>4.1 Caracterización climática del sitio de origen de los ecotipos de <i>Arabidopsis</i></b> .....	40
<b>4.2 Variación natural en la morfología de la hoja de <i>Arabidopsis</i></b> .....	42
<b>4.3 Relación entre la forma y el tamaño de las hojas con las variables bioclimáticas del sitio de origen de los ecotipos</b> .....	47
<b>4.4 Plasticidad fenotípica de la hoja en los diferentes ecotipos de <i>Arabidopsis</i></b> .....	50
<b>4.4.1 Forma y tamaño de la hoja</b> .....	50
<b>4.4.2 Tricomas</b> .....	52
<b>4.4.3 Índice de disección</b> .....	54
<b>4.4.4 Número de hojas por ecotipo</b> .....	55
<b>4.5 Relación de plasticidad y heterogeneidad ambiental</b> .....	56
<b>5.0 Discusión</b> .....	59
<b>5.1 Morfología de las hojas</b> .....	59
<b>5.2 Relación entre forma y tamaño de hoja con las variables ambientales</b> .....	60
<b>5.3 Plasticidad fenotípica de la hoja en los diferentes ecotipos de <i>Arabidopsis</i></b> .....	62

5.4 Tricomas.....	64
5.5 Índice de disección.....	64
5.6 Número de hojas.....	65
5.7 Relación de la plasticidad fenotípica con la heterogeneidad ambiental.....	66
6. Conclusiones y perspectivas.....	67
7 Literatura citada.....	69
8 Anexos.....	86
<b>Anexo 1. Protocolos.</b> .....	86
<b>Anexo 2. Tabla de las 19 variables bioclimáticas de los sitios donde provienen los ecotipos de <i>Arabidopsis</i>.</b> .....	90
<b>Anexo 3.- Protocolo de morfometría geométrica empleado para la presente investigación.</b> .....	92
<b>Anexo 4 .- Imágenes de los ecotipos bajo los tres tratamientos, vista superior.</b> .....	93
<b>Anexo 5.- Material Electrónico Suplementario.</b> .....	94
<b>Anexo 5.2 Correlaciones entre heterogeneidad ambiental y resultaods CV.</b> .....	94
<b>Anexo 6. Estadística descriptiva de los tratamientos.</b> .....	96

## Resumen

La plasticidad fenotípica es generalmente definida como la capacidad de un organismo para alterar su desarrollo a partir de señales ambientales. Normalmente se asume que la plasticidad fenotípica son cambios que permiten una mayor adecuación en comparación con individuos que no presentan los mismos cambios en el mismo ambiente. La plasticidad fenotípica es comúnmente representada por medio de diagramas de norma de reacción, en los que se compara el valor promedio de los fenotipos expresados por un solo genotipo bajo distintas condiciones ambientales. En general, dentro de la literatura biológica se reconoce la importancia ecológica y evolutiva de la plasticidad fenotípica. En algunos estudios se supone por simplicidad que los organismos se encuentran en un ambiente constante a lo largo del tiempo, en el cual expresan un fenotipo dado. Sin embargo, estas condiciones no se cumplen bajo ambientes naturales y los fenotipos se desarrollan a partir de la interacción organismo-ambiente. Hasta ahora, distintos acercamientos han identificado a la heterogeneidad ambiental como un factor que puede favorecer la plasticidad fenotípica. En este sentido, la selección natural favorecerá algunos atributos fenotípicos, ante la variabilidad de factores ambientales que comúnmente enfrentan los organismos. Sin embargo, la capacidad ontogenética para producir estas gamas de respuestas plásticas tienen costos o límites asociados a la incapacidad de los organismos de producir una óptima adecuación ante el ambiente, y por lo tanto, existe una tensión evolutiva entre la maquinaria ontogenética para producir una respuesta plástica adaptativa y las presiones selectivas que genera la variabilidad ambiental del sitio donde se desarrollan los organismos. A pesar de que comúnmente se acepta que la heterogeneidad ambiental favorece la plasticidad fenotípica, pocos estudios prácticos la han abordado. Es por eso que en el presente trabajo nos preguntamos si la heterogeneidad ambiental está relacionada con la plasticidad fenotípica, y si lo está, de qué manera. Para ello exploramos la plasticidad fenotípica desplegada en la forma y tamaño de las hojas, densidad de tricomas y número de hojas de roseta en ocho poblaciones o ecotipos de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* bajo distintas condiciones de temperatura ambiental. Se emplearon técnicas de morfometría geométrica para evaluar el cambio en la forma de la hoja y se utilizaron

técnicas de microscopia con luz polarizada para cuantificar la densidad de los tricomas bajo las distintas condiciones de temperatura. Las respuestas fueron graficadas como normas de reacción para observar el tipo y grado de respuestas. Los resultados muestran que los distintos atributos de la hoja de *Arabidopsis thaliana* en los ecotipos seleccionados responden plásticamente al cambio de la temperatura. En particular, estas diferencias son más evidentes por tratamientos que por las propias diferencias morfológicas entre ecotipos. Sin embargo, nuestros resultados contrastan con la hipótesis sobre la correlación positiva entre la heterogeneidad ambiental y la plasticidad fenotípica. Efectivamente, nosotros únicamente encontramos una correlación positiva entre los intervalos plásticos desplegados por los organismos bajo los tratamientos y la heterogeneidad ambiental (aproximada como estacionalidad de la temperatura) que presentan los sitios de distribución de las poblaciones. De hecho, para el resto de los atributos estudiados, encontramos correlaciones negativas con la estacionalidad de la temperatura. Estos resultados pueden atribuirse a que la escala espacio-temporal utilizada para el análisis de la heterogeneidad ambiental no es la relevante para probar dicha relación, o bien, debido a la compleja contribución de otros factores involucrados en la variabilidad ambiental de los sitios. Sin embargo, nuestros resultados también pueden sugerir que en la actualidad la plasticidad no está correlacionada con la estacionalidad o incluso que hay una tendencia a la canalización de algunos fenotipos cuando son expuestos a una constante variabilidad ambiental. Esto puede reflejarse en una correlación negativa en dónde una mayor variabilidad ambiental induce fenotipos canalizados, por la falta de señales fiables. Además, observamos que el ecotipo de Columbia (Col-0), el cual es comúnmente utilizado en ensayos biológicos, presenta bajos intervalos plásticos en comparación con el resto de las poblaciones estudiadas ante el cambio de la temperatura. Resaltamos este resultado, debido a que este ecotipo es comúnmente empleado como organismo de referencia y puede estar presentando fenotipos canalizados debido a su constante uso en condiciones controladas y es probable que esto a su vez genere sesgos en la información obtenida en otros estudios.

## Abstract

Phenotypic plasticity is commonly defined as the ability of an organism to express different phenotypes depending on the environment. Phenotypic plasticity is usually represented by reaction norms diagrams, which compares the average value of the phenotypes expressed by a single genotype under several environmental conditions. Nowadays, biological literature recognizes the ecological and evolutionary importance of the phenotypic plasticity. However, in many studies it is assumed by simplicity that organisms remain in a constant environment over time, in which as an outcome they express a given phenotype. Doubtless, these conditions are not fulfilled under natural conditions and the phenotypes has been developed from the organism-environment interaction. In fact, different theoretical approaches have identified environmental heterogeneity as a main factor that favors phenotypic plasticity. Although this relationship between phenotypic plasticity and environmental heterogeneity has been widely accepted, few studies have addressed it. In the present work we address the question if the environmental heterogeneity is related to phenotypic plasticity, and if it is, in which way. Therefore, we explored the phenotypic plasticity deployed in leaf shape, leaf size, trichome density and the number of rosette leaves in eight populations of *Arabidopsis thaliana* under different temperature conditions. In the present research, a geometric morphometrics approach was used to evaluate the leaf shape change and polarized light microscopy techniques were used to quantify the trichome density under the different temperature conditions. Plastic responses were plotted in reaction norms diagrams in order to visualize the type and degree of responses. The results, shows that several of the *Arabidopsis thaliana* leaf traits in different ecotypes different plastic outcomes as a response to the temperature change. However, our results contrast with the hypothesis about the positive correlation between environmental heterogeneity and phenotypic plasticity. Indeed, we did not find a positive correlation between the plastic intervals displayed by the organisms under treatments and the environmental heterogeneity (seen as temperature seasonality) in the distribution sites. In fact, a couple of analyzed traits were negative correlated with temperature seasonality. This

could be attributed to the fact that the space-time scale used for the analysis of environmental heterogeneity is not relevant to prove this relationship, or due to the complex contribution of many factors involved in the environmental variability in the natural conditions. However, our results may also suggest that the thermal plasticity in *Arabidopsis thaliana* leaves are not strongly correlated with temperature seasonality or on the other hand, there is a tendency to the canalization of some phenotypes which is reflected in a negative correlation. In addition, the ecotype of Columbia (Col-0), which is commonly used in biological experiments, show the lowest plastic intervals in the selected populations. I highlight this result, because this ecotype is commonly used as a reference organism and it might be presenting a canalized phenotypes due to its constant use under experimental conditions and it is likely that this in turn generated biases in the information obtained in following studies.

## 1 Introducción

Una noción ampliamente aceptada en el contexto de la biología evolutiva es que los genes son agentes que “guían” los procesos en el cambio adaptativo, mientras que los fenotipos son agentes que “siguen” durante este proceso (Schwander y Leimar, 2011). Bajo esta perspectiva, la evolución suele ser definida como un cambio en la frecuencia de los alelos y, por lo tanto, supone que debe de existir suficiente variación genética heredable para que la evolución ocurra mediante la selección natural. Bajo esta perspectiva, la evolución se enfoca casi exclusivamente en el papel de la sustitución alélica o en la variación genética cuantitativa (Pigliucci y Murren, 2003; Schlichting, 2004). En consecuencia, la variación fenotípica que se genera a partir de la interacción organismo-ambiente ( $O \times A$ ) sin afectar el genotipo, se considera poco relevante (Wright 1931; Simpson 1953; Williams, 1966).

En este contexto la variación que es inducida por el ambiente limitaría o reduciría la tasa de evolución porque no expone directamente al genotipo ante los efectos de la selección (de Grant, 1977; Falconer, 1981; Levin, 1988). Por esta razón, la selección que actúa sobre la variación fenotípica en una población es considerada como un tipo de selección que no produce una respuesta evolutiva (Endler, 1986). Esta perspectiva ha dado paso a que históricamente las respuestas de la interacción organismo-ambiente hayan sido descartadas como agentes relevantes (Wright, 1931; Simpson, 1953; Williams, 1966).

No obstante, durante las últimas décadas la acumulación de evidencia sugiere que la evolución de los fenotipos no puede ser explicada únicamente por el cambio en las frecuencias alélicas dentro de las poblaciones y que el resultado de la variación fenotípica tampoco puede ser generalizado como el resultado de mutaciones azarosas (West-Eberhard, 1989, 2003; Jablonka y Lamb, 2005). Estas evidencias han dado paso a generar una perspectiva que argumenta que la variación fenotípica inducida por el ambiente, y no necesariamente por mutaciones, tiene un papel importante para generar condiciones que

favorecen respuestas genéticas adaptativas (West-Eberhard, 2003). Además, en los últimos años se han observado que los factores epigenéticos también tienen una función fundamental en la evolución y en los procesos de adaptación y plasticidad fenotípica (Schlichting y Pigliucci 1998; Nicotra et al., 2010; Zhang et al., 2013).

Bajo esta perspectiva, la plasticidad fenotípica juega un papel importante en la evolución. De hecho, se ha propuesto que ésta puede ser inicialmente establecida y posteriormente ser genéticamente asimilada hasta que el estímulo ambiental inicialmente necesario para la producción del atributo ya no sea requerido (Baldwin 1896; Waddington 1942, 1952, 1953, 1956, 1959; Schmalhausen 1949; Suzuki y Nijhout, 2006). Bajo este nuevo paradigma, la plasticidad puede facilitar o incluso acelerar el proceso del cambio adaptativo (Robinson & Dukas 1999; Pigliucci y Murren 2003; Price, Qvarnstrom et al., 2003; West-Eberhard 2003; Schlichting 2004; Badyaev 2005).

### 1.1 Plasticidad fenotípica

La plasticidad fenotípica es definida generalmente como la capacidad de los organismos de alterar su desarrollo, fisiología y su historia de vida dependiendo de las condiciones ambientales a las que se encuentren expuestos (Nylin y Gotthard, 1998; Agrawal, 2001; Pigliucci, 2005). El concepto de plasticidad fenotípica ha sido definido por diversos autores y bajo diferentes supuestos (Whitman y Ananthakrishnan, 2009). Para fines prácticos de esta investigación se utilizara el término de plasticidad fenotípica como: la capacidad que presentan los organismos de modificar un atributo morfológico en respuesta a un estímulo ambiental que permita una mayor adecuación.

Los estímulos que propician la plasticidad fenotípica pueden ser generados por diferentes factores ambientales como el pH del suelo, la humedad, la temperatura, el fotoperiodo, la estacionalidad, la abundancia de depredadores o un alta densidad poblacional (Müller, 2007). Los organismos responden mediante mecanismos bioquímicos, fisiológicos,



etológicos, morfológicos en respuesta a los distintos estímulos ambientales (Agrawal, 2001). El tipo y la intensidad de respuesta son específicas a las condiciones ambientales en las que los organismos se encuentran expuestos, así como de los atributos de los organismos (Pigliucci et al., 2006). Además, el tipo de respuestas que presentan los organismos varían entre genotipos, especies y poblaciones (Weinig y Delph 2001).

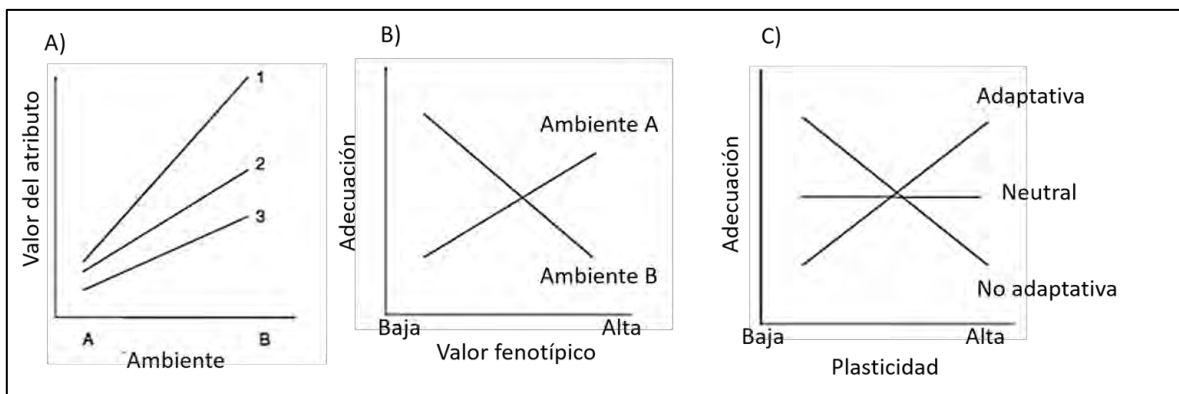
El tipo de respuestas que despliegan los organismos ante el ambiente pueden ser instantáneas cuando el estímulo ambiental es contundente, o puede ser una respuesta lenta dependiendo si el cambio en el ambiente es gradual. Posteriormente, una vez generadas las respuestas plásticas, éstas pueden variar en su permanencia y su reversibilidad. Por ejemplo, los atributos fisiológicos y conductuales pueden ser fácilmente reversibles, mientras que cambios morfológicos pueden llegar a ser permanentes (Whitman y Agrawal, 2009). En algunos casos estas modificaciones pueden llegar a ser heredadas de forma transgeneracional (Jablonka y Raz, 2009).

Finalmente, el tipo de respuesta puede ser adaptativa o no adaptativa, la primera puede contribuir a que las poblaciones se establezcan y persistan en nuevos ambientes, mientras que la plasticidad no adaptativa puede llevar a que los organismos presenten restricciones en la bioquímica, la fisiología o el desarrollo que no necesariamente llevan a los organismos a un mejor nivel de adecuación (Fordyce, 2006; Pigliucci *et al.*, 2006). Para conocer el tipo y grado de plasticidad de un atributo es necesario medir la correlación entre el valor promedio del atributo y el promedio de adecuación bajo los distintos ambientes (Scheiner, 1993). Esta correlación es generalmente conocida como norma de reacción.

## 1.2 Normas de reacción

Uno de los conceptos centrales en estudios de plasticidad fenotípica es la norma de reacción (Woltereck, 1909; Schmalhausen, 1949). Estas reflejan principalmente el tipo de plasticidad desplegada por los atributos o los organismos, generalmente cuando la respuesta es adaptativa. Las normas de reacción señalan el conjunto de fenotipos producidos por un

genotipo bajo diferentes ambientes, muestran información de los fenotipos (atributos morfológicos, conductuales, fisiológicos, etc.) colectada durante estudios experimentales, en los que, en general el investigador manipula el nivel de distintas variables independientes (variables ambientales) (Glantz, 2002). Las normas de reacción muestran diferentes curvas, cada una de las cuales representa el promedio de la respuesta de varios individuos ante uno o varios tratamientos ambientales (Pigliucci y Schlichting, 1998; Whitman y Agrawal, 2009; ver [figura 1](#)). Las formas de las normas de reacción son útiles para inferir información importante sobre la relación del organismo-ambiente ( $O \times A$ ) durante el desarrollo de los organismos (Falconer, 1990; Thompson, 1991; Via et al. 1995).



**Figura 1.-** Ejemplos de gráficas de normas de reacción. (A) Un esquema de norma de reacción que muestra la respuesta de tres organismos (1, 2 y 3) expuestos a dos ambientes (A y B). El organismo 1 muestra la mayor plasticidad fenotípica en comparación con los organismos 2 y 3. (B) y (C) muestran ejemplos de plasticidad adaptativa; estos datos se analizan frecuentemente seleccionando gradientes (bajo - alto). En (B) la adecuación se maximiza cuando hay un valor mayor del atributo fenotípico en el ambiente A, mientras que la adecuación es menor para cierto atributo en el ambiente B. (C) Representa un diferente enfoque para evaluar la plasticidad adaptativa en la cual una medida de plasticidad (absoluta o un índice) es graficado contra el promedio de la adecuación, la relación puede ser adaptativa, neutra o incluso no adaptativa (imagen tomada y modificada de Nicotra *et al.*, 2010).

Las normas de reacción tienen tres características generales relevantes para los análisis: (1) El eje de X (variable independiente) debe medir el parámetro ambiental al cual el organismo es expuesto, (2) el eje de Y (variable dependiente) muestra el valor que refleja el fenotipo en respuesta de cada manipulación ambiental, (3) la pendiente de una norma de reacción muestra la intensidad de la respuesta fenotípica de un organismo a cambiar en un parámetro ambiental, es decir, mayores valores (negativos o positivos) en las pendientes representan una mayor sensibilidad al ambiente (Fuller et al., 2005).

Los análisis basados en normas de reacción requieren de al menos tres, y preferentemente más valores experimentales por fenotipo. Para usar las gráficas de normas de reacción con propósitos inferenciales, es necesario graficar al menos las respuestas para dos organismos. Esto permite comparar sus reacciones fenotípicas bajo diferentes tratamientos experimentales. Cada punto en la gráfica representa el valor promedio del atributo o del organismo, cada punto tiene barras de error que representan la sensibilidad fenotípica bajo diferentes niveles del parámetro experimental.

### 1.3 Plasticidad adaptativa

La capacidad de modular el desarrollo dependiendo del ambiente puede en principio ser de valor adaptativo (Schlichting, 1986). Ésta capacidad de modificar el desarrollo permite una mayor adecuación de los organismos bajo un entorno heterogéneo (Sultan, 2000). En comparación, los organismos que no presentan cambios ante la variabilidad ambiental espacio-temporal presentan una baja adecuación (Ghalambor et al., 2007). Es decir, las poblaciones con alta plasticidad fenotípica en rasgos funcionales importantes presentan mayor adecuación ante cambios en las condiciones ambientales, sin la necesidad de generar una adaptación genética (Valladares et al., 2007; Crispo, 2008).

En este sentido la plasticidad fenotípica al ser adaptativa desempeña un papel importante en la diversificación evolutiva de los organismos en nuevos ambientes (Vía y Lande, 1985; Schlichting, 1986; Scheiner, 1993), así como en la distribución y persistencia de las especies (Reusch y Wood, 2007; Chevin et al., 2010; Nicotra et al., 2010, Palmer et al., 2012). Un ejemplo son las especies invasoras, las cuales suelen presentar mayor capacidad para modificar su desarrollo en comparación de las especies nativas con las que compiten, adaptándose así rápidamente a una nueva área geográfica (Sultan, 2003; Lande, 2009).

Sí la plasticidad es adaptativa y permite que una población persista en un ambiente nuevo o cambiante, este puede volverse genéticamente asimilado o será ajustado mediante la

selección natural, a pesar de que en un principio no se generó un fenotipo con una adecuación óptima (Pigliucci et al., 2006). Este fenómeno puede acelerar la adaptación fenotípica ante nuevas condiciones de crecimiento, permitiendo que toda una población persista mediante plasticidad adaptativa con fenotipos adaptativos favorecidos por la selección natural (Crispo, 2008). Recientemente se ha propuesto que el estudio de la plasticidad fenotípica debe ser fundamental para evaluar los efectos del cambio climático (Charmantier et al., 2008; Nicotra et al., 2010; Merilä y Andrew, 2014).

### 1.3 Plasticidad no adaptativa

Como se describió con anterioridad, la plasticidad es generalmente considerada como adaptativa. Sin embargo, es importante señalar que la variación fenotípica que despliegan los organismos en diferentes ambientes puede no afectar la adecuación en absoluto, o incluso puede tener un impacto negativo en la adecuación. El impacto negativo que tiene la plasticidad en la adecuación es conocida como plasticidad no adaptativa. Tal plasticidad puede reflejar un desarrollo con efectos negativos en el éxito individual, causados principalmente por el estrés ante la limitación de recursos (Sultan, 2000; Weiner, 2004; Van Kleunen y Fischer, 2005; Van Buskirk y Steinger, 2008).

La plasticidad no adaptativa reduce la probabilidad de persistencia de los organismos en un nuevo ambiente y por lo tanto aumenta la fuerza de la selección. Grether (2005) sugiere que cuando una especie encuentra nuevas condiciones ambientales se desencadenan cambios fenotípicos con una baja adecuación. En estas condiciones la selección favorecerá en un inicio cambios genéticos que contrarresten la baja adecuación para restaurar el fenotipo a su estado ancestral. Este fenómeno es conocido como compensación genética. Hasta ahora, se ha visto que este fenómeno reduce la variación fenotípica y promueve la divergencia genética (Ghalambor et al., 2007; Fitzpatrick, 2012).

## 1.4 Costos y límites de la plasticidad

A pesar de parecer obvios los beneficios de la plasticidad, los intervalos plásticos en las poblaciones naturales no son “perfectos” o “ilimitados”, es decir, la plasticidad tiene límites y costos (Pigliucci y Schlichting, 1995; Van Kleunen y Fischer, 2005). Los costos son definidos como los déficits de adecuación asociados con los genotipos plásticos en comparación con los genotipos fijos, que producen el mismo fenotipo promedio en un ambiente particular (DeWitt et al., 1998). Por lo general los costos hacen referencia a los requisitos necesarios que presenta el aparato ontogenético para producir una gama de cambios plásticos ante la variabilidad ambiental y que de otra forma se estarían dirigiendo al crecimiento, la reproducción, entre otros. Los costos son evidentes cuando, en condiciones ambientales similares, la adecuación de un organismo plástico es menor en comparación con la que presenta un organismo no plástico. Se han identificado varios costos de la plasticidad y los más comunes parecen estar asociados a la detección de las condiciones ambientales y la transducción de estas señales en las respuestas del desarrollo (DeWitt et al., 1998, Auld et al., 2010).

Los límites son restricciones funcionales que reducen los beneficios de la plasticidad comparada con la plasticidad adaptativa que permite la adecuación de los organismos bajo todas las circunstancias. Los límites pueden reducir la adecuación y reflejan una respuesta plástica de baja adecuación. Hasta ahora los límites registrados con mayor frecuencia se atribuyen a la baja correlación entre el estímulo ambiental que desencadena la plasticidad y las condiciones reales del ambiente, así como, el retraso en la detección de la señal ambiental y la respuesta y los límites asociados al desarrollo, en el cual la maquinaria ontogenética es incapaz de producir fenotipos extremos que son posibles a través de un desarrollo fijo (Van Kleunen y Fischer, 2005, Valladares et al., 2007).

## 1.5 Heterogeneidad ambiental

Distintos modelos han identificado varios factores que limitan o favorecen las condiciones para que la plasticidad sea desplegada. Algunos factores son complejos y pocos han sido sometidos a prueba para verificar sus predicciones. No obstante, la mayoría de los modelos predicen que la heterogeneidad ambiental es una condición necesaria, aunque no suficiente, para que la condición de plasticidad sea favorecida (Via y Lande, 1985; Gabriel y Lynch, 1992; Gomulkiewicz y Kirkpatrick, 1992; Moran, 1992; Gabriel y Lynch, 1992; Zhivotovsky, 1996; Van Tienderen, 1997; Sultan y Spencer, 2002; Ernande y Dieckmann, 2004). Una conclusión general de los modelos es que bajo un ambiente uniforme se favorecerá un fenotipo fijo (organismos especialistas), incluso si la plasticidad no es costosa, mientras que en ambientes heterogéneos y bajo una fuerte competencia tienden a generarse fenotipos plásticos (organismos generalistas) (Van Tienderen, 1997; Sultan, 2003). A pesar de que este supuesto ha sido aceptado en los distintos modelos, pocos estudios se han enfocado empírica o experimentalmente en saber de qué forma la heterogeneidad ambiental es necesaria para que la plasticidad como condición se vea favorecida o restringida (Pigliucci, 2005).

La heterogeneidad ambiental no es un concepto fácil de definir (Pickett y Rogers, 1997; Wiens, 1989, 2000). Sin embargo, se entiende como heterogeneidad ambiental a la relación entre las variaciones temporales y espaciales en el ambiente (Stewart et al., 2000). Estas variables son todos aquellos factores como el suelo (profundidad, disponibilidad de nutrientes, pH, etc.), el clima (temperatura, humedad, incidencia de luz, etc.), los mismos organismos y sus interacciones (competencia, depredación, etc.) (Rees et al., 1996). Estos factores relacionados a la heterogeneidad ambiental tiene marcadas consecuencias ecológicas para los organismos, ya que estos actúan como agentes selectivos en la adecuación de los mismos (Stewart et al., 2000).

La heterogeneidad ambiental se puede analizar a través de dos dimensiones, la espacial y la temporal (Milne, 1991; Sparrow, 1999). La heterogeneidad de tipo espacial está relacionada con diferencias regionales entre las unidades geográficas (Stewart et al., 2000). La heterogeneidad temporal denota la complejidad de las interacciones entre los factores bióticos y abióticos relacionadas con el tiempo y el uso de los recursos que experimentan los organismos durante su ciclo de vida (Terradas, 2009).

La evolución de la plasticidad fenotípica en condiciones heterogéneas ha sido ampliamente modelada en relación a variaciones espaciales y temporales en comunidades vegetales (Levins 1968; West-Eberhard, 1989; Grime, 1994; Via et al., 1995; Jackson y Caldwell, 1996; Sultan, 2000; DeWitt y Scheiner, 2004). Se ha observado que las variaciones temporales suelen ocurrir con mayor rapidez en comparación con la velocidad a la que los organismos modifican su fenotipo, reduciendo así la probabilidad de que la plasticidad evolucione. Generalmente estas variaciones se deben a eventos que cambian las condiciones climáticas, afectando así la disponibilidad o el total de los recursos (los patrones de estacionalidad, disturbios ambientales y el uso del recursos por otros organismos) (Ehleringer, 1984).

### 1.6 Plasticidad fenotípica en las plantas

Las plantas, al ser organismos sésiles, están fuertemente condicionadas por el ambiente que las rodea en el cual tienen que completar su ciclo de vida (de Jong y Leyser, 2010). Además, es probable que los ambientes donde éstas habitan cambian constantemente en el tiempo y el espacio. Por ejemplo, factores como la intensidad de luz, la temperatura, la humedad, la precipitación, la disposición de nutrientes presentan variaciones diurnas o anuales (Bradshaw, 1965; Sultan 2000).

Un factor ampliamente estudiado en plantas es la temperatura. Se ha registrado que la temperatura modifica la tasa fotosintética, dependiendo de la alta o baja incidencia de luz (Reynaud et al., 2003). Uno de los mecanismos para responder al cambio de luz y

temperatura es la producción de antocianinas en las hojas. Esta respuesta es un mecanismo plástico para la protección de la maquinaria fotosintética y es un mecanismo reversible (Steyn et al., 2002; Tallis et al., 2010). Así mismo, se han reportado respuestas morfológicas ante el cambio de temperatura como el tamaño del organismo, la longitud del internodo, la orientación de la hoja, la orientación del meristemo, las ramificaciones, la elongación de los peciolos y el tallo (Myster y Moe, 1995).

La plasticidad que presentan las plantas posiblemente se debe a la naturaleza continua y muchas veces indeterminada del desarrollo de las plantas (Palmer et al., 2012). Es decir, las plantas tienen por lo general un constante desarrollo post-embionario en el cual desarrollan diferentes estructuras bajo distintas condiciones ambientales. Esto permite generar una amplia gama de fenotipos (de Jong y Leyser, 2012).

Los primeros estudios de plasticidad fenotípica en las plantas se centraron en descriptores simples de crecimiento y morfología tales como el tamaño de la planta, número de ramificaciones y la longitud de los internodos. Asimismo, otros estudios incluían aspectos fisiológicos funcionales directamente relacionados al éxito funcional y reproductivo de los organismos, como la asignación proporcional de nutrientes a diferentes tejidos de la planta o tasas de asimilación, entre otros (Schlichting, 1986; Bradshaw y Hardwick, 1989). Una de las posibles razones en el incremento de estudios sobre la plasticidad fenotípica en plantas se debe a que estas pueden ser fácilmente clonadas y expuestas a distintos ambientes controlados.

Recientemente los estudios de plasticidad incluyen aspectos más detallados de atributos que se encuentran directamente relacionados con la adquisición de recursos. Estos incluyen el tamaño de la hoja y el área foliar de toda la planta, ambos aspectos están involucrados directamente en la captura de luz fotosintética (Charmantier et al., 2008; Nicotra et al., 2010; Merilä y Andrew, 2014).



Uno de los órganos que presenta un amplio interés en los estudios de plasticidad fenotípica es la hoja. Las hojas son estructuras morfológicamente diversas y plásticas (Kaplan, 2001), las cuales reflejan compensaciones funcionales que han sido resueltas de distintas maneras por las diferentes especies desde su contexto ecológico, su fisiología, ontogenia y sus historias de vida (Nicotra et al. 2011). Las hojas son órganos laterales, generalmente planos, que se producen en los meristemos apicales durante el desarrollo de las plantas (Dengler y Tsukaya, 2001; Poethig, 1997). Por lo general, dentro de estas estructuras se realizan funciones vitales en plantas como la fotosíntesis y el intercambio gaseoso (Poethig, 1997).

Diversos estudios han abordado el estudio de la plasticidad en diferentes atributos de la hoja en una amplia gama de especies (Rozendaal, 2006). Estos estudios se han enfocado a estudiar las respuestas plásticas ante factores como la intensidad de luz (Jarcurska et al., 2011), el tipo de sustrato (Perez et al., 1994; Sultan, 2003), la temperatura (Royer et al., 2009), y la presencia de depredadores (Rosenthal y Kotanen, 1994; Agrawal, 2001). Así mismo, diferentes medidas se han utilizado para evaluar la amplia gama de respuestas de los atributos ante estos factores ambientales (la longitud, el área y el grosor de la hoja, el peso seco, contenido de clorofila, densidad estomática, número de dientes, entre otros). Sin embargo, una cuantificación detallada de la forma de la hoja pocas veces se ha realizado.

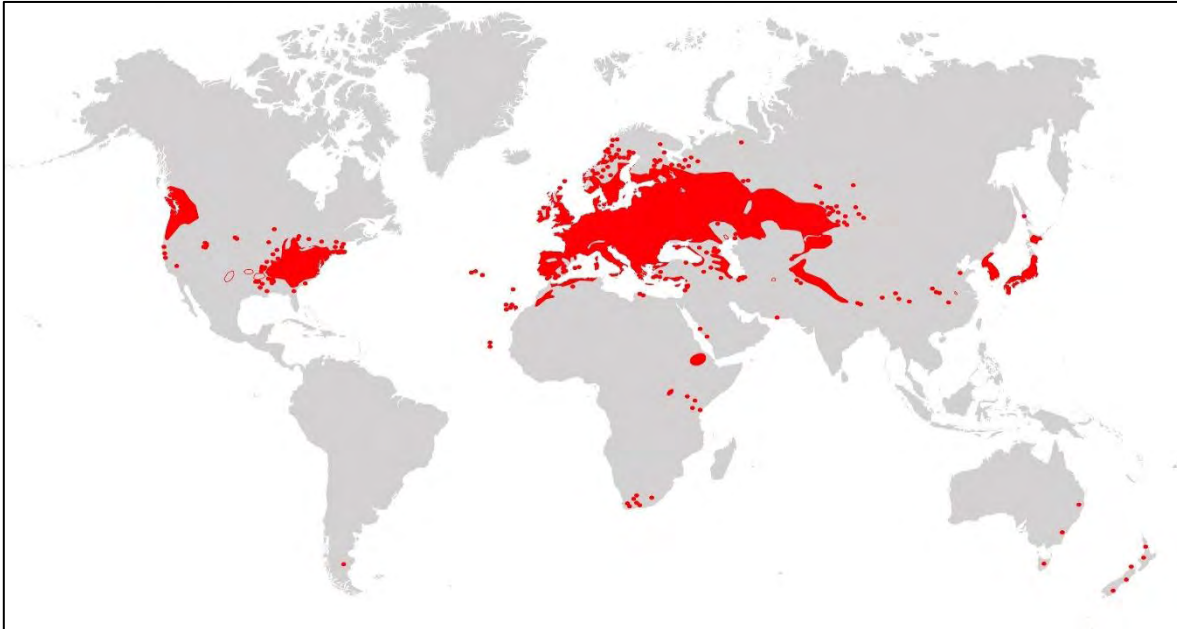
### 1.7 Plasticidad fenotípica en *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis* en adelante) es una planta modelo que se ha utilizado para estudiar el potencial de la interacción planta-ambiente, entre muchos otros aspectos de la biología de las plantas (Meinke et al., 1998; Alonso-Blanco y Koorneef, 2000). Es una planta pequeña que mide de 10 a 30 cm de alto, tiene un ciclo de vida corto de entre 6 y 8 semanas y pertenece a la familia Brassicaceae (Haughn y Kunst, 2010). Esta planta tiene gran importancia como organismo modelo y cuenta con disponibilidad de datos genéticos y genómicos recopilados en diversas bases de datos (Alonso-Blanco et al., 2009). Presenta autopolinización y genera individuos genéticamente idénticos, los cuales pueden ser

comparados a través de distintas condiciones de crecimiento en el laboratorio o sitios en campo (Meinke et al., 1998).

*Arabidopsis* presenta una amplia gama de variantes fenotípicas entre poblaciones silvestres, las cuales son conocidas como ecotipos. Este concepto resalta la diferencia ambiental y geográfica entre las poblaciones de estudio, bajo el supuesto de que ha habido adaptaciones locales (Turesson, 1992). A la fecha, se han recolectado 2000 accesiones de *Arabidopsis* alrededor del mundo ([figura 2](#)). Estas poblaciones son variables en cuanto a su forma, desarrollo y fisiología, lo que se refleja en diferentes adaptaciones locales (Pico et al., 2008). Existen varios reportes en los que se ha caracterizado las diferencias en su arquitectura aérea (MacGregor et al., 2008) o radicular de algunos de los ecotipos (Aceves et al., 2016). Frecuentemente, el ecotipo de Columbia (Col-0) se utiliza como ecotipo de referencia el cual se ha producido constantemente en laboratorios de Estados Unidos de América para estudios de genética y desarrollo. El resto de los ecotipos han sido escasamente descritos, aun cuando pueden proveer información relevante respecto a la ecología y evolución de esta planta modelo.

*Arabidopsis* presenta hojas basales en forma de roseta y también puede presentar hojas en el tallo que son sésiles (caulinares). El desarrollo de la hoja de *Arabidopsis* se ha caracterizado a partir de tres eventos principales. El primero es la iniciación de la hoja, seguido de un crecimiento de la hoja y finalmente la expansión y maduración de la hoja y el margen. Estos eventos están estrechamente regulados por factores genéticos y ambientales y son regulados espacial y temporalmente (Tsukaya et al., 2000, 2003, 2005; Cookson et al, 2007; El-Soda et al., 2014).



**Figura 2.-** Mapa de la distribución mundial de los ecotipos de *Arabidopsis thaliana*. Las áreas en rojo corresponden a la distribución continua de *A. thaliana* (mapa elaborado por Matthias Hoffmann, 2014. Crédito por Ute Krämer y Klaus Hagemann, 2008).

Generalmente, las hojas de *Arabidopsis* presentan tricomas unicelulares que se encuentran en la mayoría de los órganos aéreos, incluyendo las hojas de roseta, el tallo, las hojas caulinares y los sépalos (únicamente no se encuentran en los cotiledones) (Szymanski y Marks, 1998). El desarrollo de los tricomas de *Arabidopsis* está regulado por una red de factores genéticos, hormonales y ambientales, y de igual modo son regulados espacial y temporalmente en la epidermis de la hoja (Hulskamp et al., 1998; Benitez y Espinosa-Soto, 2002, 2008; Morohashi et al., 2009; Benítez et al., 2011).

*Arabidopsis* es un excelente sistema para el estudio de la plasticidad fenotípica, ya que presenta cambios en distintos atributos en respuesta al ambiente y tiene poblaciones distribuidas en sitios que presentan diferencias en su heterogeneidad espacial y temporal. Además, cuenta con gran cantidad de información disponible en bases de datos y puede ser utilizada en una amplia gama de diseños experimentales, permitiendo así estimar el grado de plasticidad fenotípica bajo distintas condiciones ambientales.

En este trabajo se evaluó la plasticidad de ocho ecotipos de *Arabidopsis* bajo tres diferentes condiciones de temperatura. Se registró la variación de las respuestas plásticas que muestran los atributos de la forma de la hoja, densidad de tricomas y número de hojas. El objetivo principal fue conocer si las diferencias en la plasticidad fenotípica de los atributos bajo los tratamientos ambientales se relacionan positivamente con la heterogeneidad ambiental de los sitios de donde provienen los ecotipos.

## **2. Hipótesis y objetivos**

### **2.1 Hipótesis**

La presente investigación pone a prueba una de las hipótesis centrales en los estudios de plasticidad fenotípica: Los organismos vegetales que presentan mayores intervalos de plasticidad fenotípica se encuentran en sitios con mayor variación ambiental.

Por lo tanto, si esta hipótesis fuese verdadera, se esperaría que se cumplieran las siguientes predicciones:

1. Las poblaciones (ecotipos) de *Arabidopsis* presentarán distintas morfologías en sus hojas de roseta, debido a las distintas condiciones geográficas-ambientales de las que provienen.
2. Las poblaciones de *Arabidopsis* localizadas en sitios con mayor variación en la estacionalidad de la temperatura (ambientes heterogéneos) presentaran mayores intervalos plásticos en comparación de las poblaciones bajo temperaturas estables y constantes (ambientes homogéneos).

### **2.2 Objetivo general**

Para poner a prueba la hipótesis central de este trabajo fue necesario analizar los atributos de las hojas en cada ecotipo y las respuestas plásticas de diferentes atributos en distintos ecotipos de *Arabidopsis* bajo un conjunto de tratamientos experimentales. Por consiguiente, el objetivo principal de este trabajo fue: evaluar la relación de la plasticidad

fenotípica exhibida por los distintos atributos de la hoja de los ecotipos bajo los tratamientos ambientales, con la variabilidad ambiental del sitio de origen de cada población.

Para esto se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Seleccionar poblaciones de *Arabidopsis* que se distribuyan bajo diferentes condiciones geográficas y ambientales.
2. Caracterizar la variación de la temperatura de los sitios donde se ubican los diferentes ecotipos.
3. Establecer un diseño experimental que permita evaluar la plasticidad de distintos atributos de los organismos de *Arabidopsis* ante un cambio en la temperatura.
4. Generar un protocolo para producir imágenes de microscopía con luz polarizada para cuantificar de forma semi-automatizada la densidad de tricomas en la epidermis de la hoja de los distintos ecotipos bajo los distintos tratamientos.
5. Evaluar mediante técnicas de morfometría geométrica la varianza en la forma de la hoja dentro y entre los distintos ecotipos de *Arabidopsis*. Así mismo, cuantificar esta variación entre tratamientos.
6. Describir, a partir de gráficas de normas de reacción, el tipo y grado de plasticidad que presentan los atributos medidos en los ecotipos ante el cambio en la temperatura.

### **3. Materiales y métodos**

Para alcanzar los objetivos planteados y poner a prueba la hipótesis central en la presente investigación, se seleccionaron ocho poblaciones (ecotipos) de *Arabidopsis* distribuidas bajo diferentes zonas geográficas y condiciones ambientales ([Tabla 1](#)). En la presente investigación se estudió la hoja de roseta de *Arabidopsis* debido a que existen registros que indican que su forma, tamaño y densidad de tricomas son atributos los cuales son regulados por factores ambientales y genéticos durante su desarrollo. Además, es importante señalar que no se ha realizado la evaluación empírica y sistemática del efecto de variables ambientales en la densidad de tricomas de *Arabidopsis*. Finalmente, estos resultados son

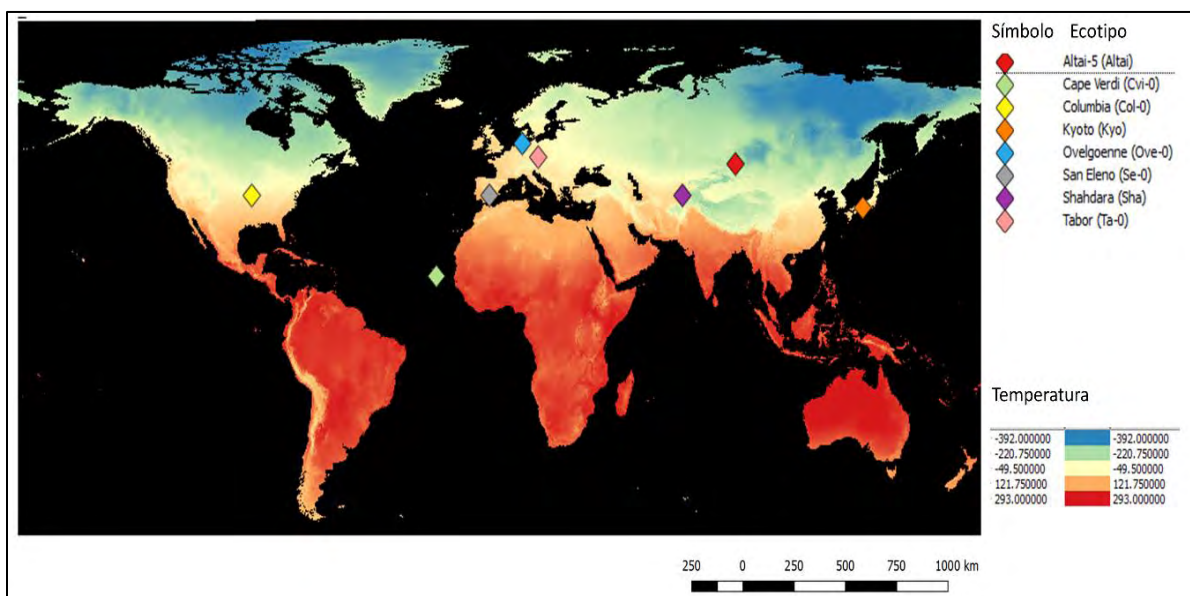
parte de un proyecto más amplio en el que en última instancia se pretende integrar esta información con modelos mecanísticos del desarrollo de los patrones de tricomas en las hojas.

### 3.1 Material vegetal

Las semillas de los ocho ecotipos fueron facilitadas por la Dra. Ma. De la Paz Sánchez Jiménez del Laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología de la UNAM, quien previamente adquirió las semillas a través de “The European Arabidopsis Stock Centre” (NASC) (<http://arabidopsis.info/2016>). La información geográfica de los ecotipos seleccionados se adquirió en la página <https://www.arabidopsis.org/2016> y puede verse en la [Tabla 1](#). Asimismo, la distribución geográfica y los valores de la temperatura promedio anual (MAT por sus siglas en inglés) pueden verse en la [figura 3](#), la cual fue realizada con Qgis versión 2.14 (<http://qgis.osgeo.org>).

**Tabla 1.-** Caracterización geográfica y número de inventario de los ocho ecotipos de *Arabidopsis* utilizados en la presente investigación.

Ecotipo	Número de inventario	Latitud Norte	Longitud Este	Altitud (msnm)	País
<b>Columbia (Col-0)</b>	N1092	-	-	-	E.U.A.
<b>Cabo Verde (Cvi-0)</b>	CS8580	15.1	-23.6	304	Cabo Verde
<b>Tabor (Ta-0)</b>	CS6867	49.3	16.8	567	Republica Checa
<b>San Eleno (Se-0)</b>	CS6852	41.5	2.2	222	España
<b>Altai (altai-5)</b>	CS76433	47.75	88.4	912	China
<b>Kyoto (Kyo)</b>	CS28425	43	141.3	27	Japón
<b>Ovelgoenne (Ove-0)</b>	CS6823	49	11	533	Alemania
<b>Shahdara (Sha)</b>	CS76227	38.3	68.4	646	Tajikistan



**Figura 3.-** Mapa de la temperatura promedio anual y la distribución geográfica de los ecotipos seleccionados de *Arabidopsis*. Capa de temperatura media anual se obtuvo a partir de Worldclim.com. (Hijmans et al., 2005).

### 3.2 Caracterización ambiental

La variabilidad climática que presentan los sitios donde se distribuyen los ocho ecotipos, se estimó a partir de las 19 variables bioclimáticas (tabla 2) extraídas de WorldClim (Hijmans et al., 2005). El proceso consistió en interpolar capas climáticas generadas a nivel global y a partir de estas extraer los valores desde las estaciones ambientales de donde provienen los ecotipos. Con el fin de obtener información detallada, en el presente estudio se utilizaron gradillas rasters con una resolución espacial de 30' (aproximadamente 1 km<sup>2</sup> de resolución) por cada sitio de donde provienen los ecotipos.

**Tabla 2.-** Descripción de las 19 variables bioclimáticas obtenidas desde <http://www.worldclim.org/> 2016.

	Variable ambiental	Descripción de la variable
1	Temperatura media anual °C	$((t_{max1} + t_{max2} + \dots + t_{max12})/12 + (t_{min1} + t_{min2} + \dots + t_{min12})/12)/2$ , en cada estación
2	Rango de temperatura media diurna	$((t_{max1} + t_{max2} + \dots + t_{max12})/12 - (t_{min1} + t_{min2} + \dots + t_{min12})/12)$ , en cada estación
3	Isotermalidad/ índice de variabilidad de la temperatura	(intervalo promedio de temperatura diurna/ intervalo de temperatura anual)(*100)

4	<b>Estacionalidad de la temperatura</b>	(desviación estándar *100) en cada estación
5	<b>Temperatura máxima del mes más cálido (°C)</b>	De las 12 climatologías mensuales de temperatura máxima, se elige el valor más alto por estación
6	<b>Temperatura mínima del mes más frío (°C)</b>	De las 12 climatologías mensuales de temperatura mínima, se elige el valor más bajo por estación
7	<b>Intervalo de temperatura anual (°C)</b>	(temperatura máxima del mes más cálido- temperatura mínima del mes más frío)
8	<b>Temperatura promedio del trimestre más húmedo</b>	$((T_{max1}+T_{max2}+T_{max3})/3) + ((T_{min1}+T_{min2}+T_{min3})/3) / 2$ , por estación
9	<b>Temperatura promedio del trimestre más seco</b>	$((T_{max1}+T_{max2}+T_{max3})/3) + ((T_{min1}+T_{min2}+T_{min3})/3) / 2$
10	<b>Temperatura promedio del trimestre más cálido</b>	$((T_{max1}+T_{max2}+T_{max3})/3) + ((T_{min1}+T_{min2}+T_{min3})/3) / 2$
11	<b>Temperatura promedio del trimestre más frío</b>	$((T_{max1}+T_{max2}+T_{max3})/3) + ((T_{min1}+T_{min2}+T_{min3})/3) / 2$
12	<b>Precipitación anual</b>	(prec1 + prec2 + ... + prec12)
13	<b>Precipitación del mes más húmedo</b>	De las 12 climatologías mensuales de precipitación, se elige el valor más alto por estación
14	<b>Precipitación del mes más seco</b>	De las 12 climatologías mensuales de precipitación, se elige el valor más bajo por estación
15	<b>Estacionalidad de precipitación (coeficiente de variación)</b>	(Desviación estándar (prec1, prec2,...,prec12)*100)/(1+((prec1+ prec2...+prec12)/12))
16	<b>Precipitación del trimestre más húmedo</b>	Prec1+Prec2+Prec3, por estación
17	<b>Precipitación del trimestre más seco</b>	Prec1+Prec2+Prec3, por estación
18	<b>Precipitación del trimestre más cálido</b>	Prec1+Prec2+Prec3, por estación
19	<b>Precipitación del trimestre más frío</b>	Prec1+Prec2+Prec3, por estación

### 3.3 Diseño experimental

Para abordar la hipótesis central del presente estudio fue necesario establecer un diseño experimental que permitiera caracterizar el tipo y los intervalos de las respuestas plásticas de los distintos atributos bajo condiciones ambientales controladas. Por consiguiente, el diseño experimental consistió en la siembra de los ocho ecotipos seleccionados bajo distintas condiciones ambientales (tratamientos) en la misma cámara de crecimiento (esto reduce el ruido generado por distintas cámaras de crecimiento). Los tratamientos consistieron en modificar la temperatura ambiental dentro de la cámara. Se seleccionó la temperatura por ser un factor importante en el desarrollo de la planta, así como uno de los

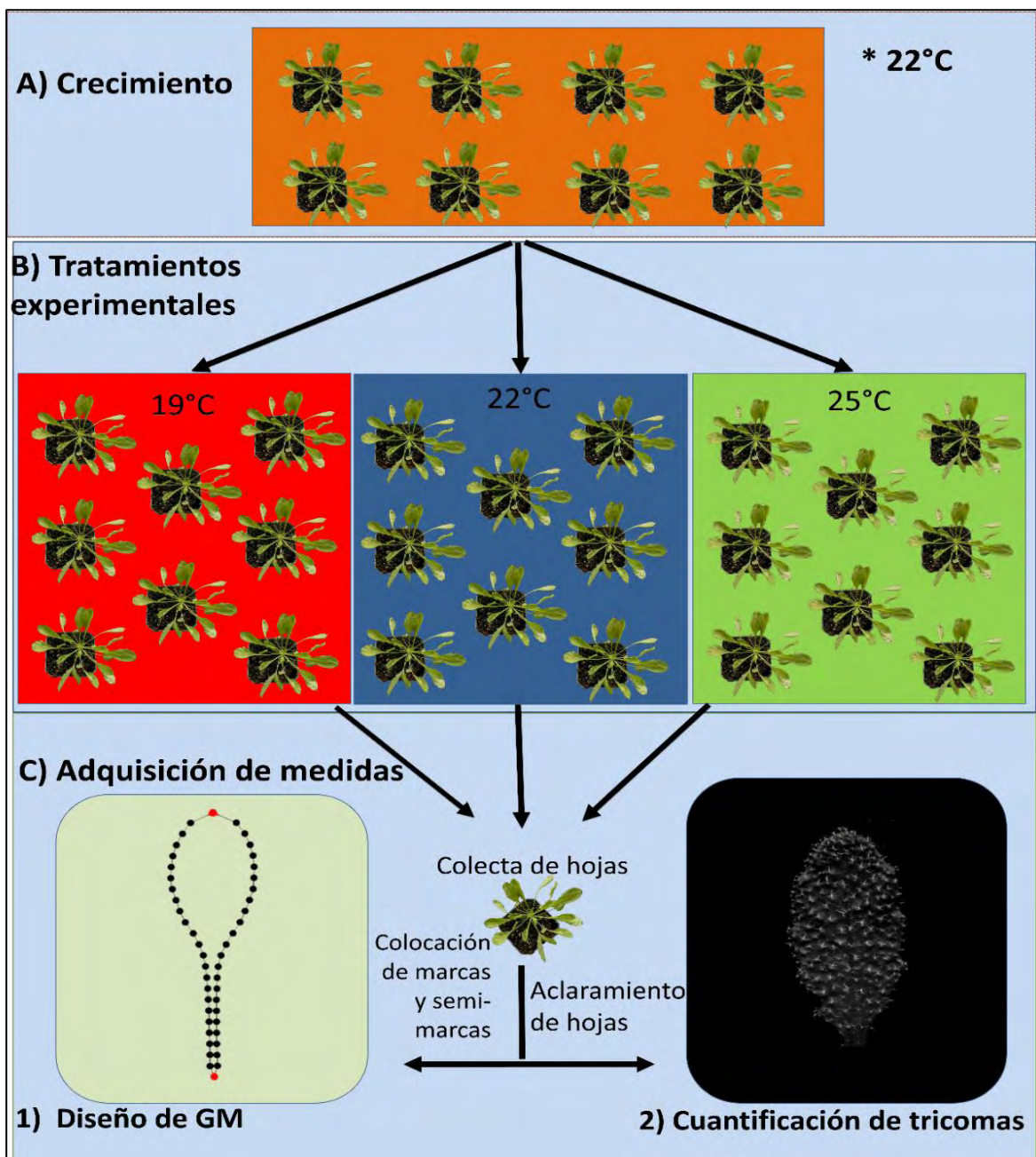


principales reguladores ambientales de la morfogénesis de las hojas de distintos organismos (Chitwood y Sinha, 2016).

Como primer paso se generó un semillero de los ecotipos seleccionados para contar con un acervo común de semillas, las cuales fueron posteriormente utilizadas en los tratamientos ambientales ([figura 4a](#)). Todas las siembras de los ecotipos se realizaron bajo condiciones de iluminación de día largo (16 horas luz/ 8 horas oscuridad) con luz blanca y fría a una intensidad de  $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y riego constante de 1300 mL por charola (aprox. 32 macetas por charola). En los tratamientos, todas las semillas fueron incubadas durante cuatro días a una temperatura de  $4^\circ\text{C}$  para romper la dormancia. Subsecuentemente fueron colocadas en macetas de 2 cm de diámetro y 5 cm de profundidad con un sustrato de Agrolita, *Peat moss* (musgo *Sphagnum* descompuesto y comprimido) y vermiculita (1:1:1). Todas las siembras experimentales se realizaron con al menos 12 individuos por ecotipo. Se generó una  $n$  total de 345 organismos a partir de los tres tratamientos.

La primera siembra experimental (control) se realizó a  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  en la cámara de crecimiento con las condiciones previamente descritas. Se seleccionó esta temperatura ya que recurrentemente los estudios con *Arabidopsis* emplean esta temperatura como referencia. Posteriormente, se realizaron siembras bajo temperaturas de  $19 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  ([figura 4b](#)). Se seleccionaron estas temperaturas porque son valores cercanos a la referencia o control y no comprometen la germinación de los organismos, pero permiten explorar en intervalos similares una temperatura mayor y una menor. Finalmente,  $37 \pm 1$  días posteriores a la germinación, se colectó la sexta hoja de los organismos bajo los distintos tratamientos.

Se seleccionó este tiempo debido a que la diferenciación celular y la expansión de la lámina foliar han concluido.



**Figura 4.-** Esquema general del diseño experimental utilizado en la presente investigación. A) siembra "semillero" con condiciones controladas bajo 22°C, para generar el acervo de semillas que fueron empleadas en las siguientes siembras experimentales. B) tratamientos experimentales con los ocho ecotipos en la cámara ambiental a 22°C, 19°C y 25 °C. C) Adquisición de las distintas medidas a partir de las imágenes de las hojas, 1) plantilla utilizada para los análisis de morfometría geométrica, 2) cuantificación de tricomas a partir de técnicas de microscopía polarizada.

La selección de la sexta hoja de *Arabidopsis* se realizó con base en el método propuesto por Farmer y colaboradores (2013). Esto permitió mejorar la reproducibilidad de los experimentos y examinar de manera adecuada los análisis de la plasticidad. Además, realizar este procedimiento permitió un adecuado conteo del número de hojas bajo los tratamientos para los diferentes ecotipos. Este atributo, también fue considerado para evaluar la plasticidad fenotípica en los ocho ecotipos de *Arabidopsis*.

### 3.4 Adquisición de imágenes, medidas y tricomas

Para realizar los distintos análisis de los atributos de las hojas, fue necesario generar varios conjuntos de imágenes y así realizar **para** cada tratamiento la cuantificación del cambio fenotípico de los atributos seleccionados por tratamiento. Por esta razón, los conjuntos de imágenes se realizaron tanto por cada planta, como por ecotipo y por tratamiento. Las hojas fueron escaneadas por la superficie adaxial con un escáner Epson Perfection V-700 a una resolución de 300 dpi., las mediciones del área y el perímetro de la hoja se realizaron con el programa ImageJ 1.31 (Abràmoff et al., 2004; Schneider et al., 2012). El área de las hojas se estandarizó utilizando el método propuesto por Abràmoff y colaboradores (2004), este método consiste en extraer el área total unilateral del tejido foliar por unidad de superficie conocida.

También se utilizó el índice de disección (ID) propuesto por McLellan y Endler (1998) como otro descriptor del cambio en la forma de las hojas. Este índice se ha utilizado para describir cambios en la forma de la hoja bajo distintos tratamientos (McLellan, 2005; Kimura et al., 2008; Xu et al., 2009; Tsukaya, 2010, 2011; Sicard et al., 2014; Nakayama y Kimura 2015). Este índice señala que altos valores están relacionados a una mayor lobulación de la hoja, es decir a hojas compuestas. Mientras que valores bajos están asociados a hojas simples. El índice de disección (ID) es la proporción entre el perímetro ( $p$ ) de un contorno y la raíz cuadrada de su área ( $a$ ) estandarizada por  $\pi$ .

$$ID = \frac{p}{\pi\sqrt{a}}$$

La densidad de tricomas en la epidermis de las hojas fue analizada a partir de una plataforma semi-automatizada que permitió determinar el número y la disposición de los tricomas a partir de imágenes de alto contraste. Para lograr estas imágenes, fue necesario que las hojas pasaran por un proceso de aclaramiento. Este proceso se realizó según el método propuesto por Gudesblat y colaboradores (2012), con algunas modificaciones, el cual consiste en remover la clorofila mediante una serie de baños de etanol. Posteriormente, una vez que las hojas son aclaradas, se utilizan técnicas de microscopia de luz polarizada como se describe en Pomeranz y colaboradores (2013). Se obtuvieron imágenes con los tricomas de *Arabidopsis* iluminados sobre un fondo negro. El protocolo para la adaptación del microscopio estereoscópico y la descripción del proceso de aclaramiento de hojas, puede consultarse en el [Anexo 1](#), el cual también se encuentra disponible públicamente en la página web: <http://laboratoriostropic.wixsite.com/laparcela>.

Una vez que las imágenes de alto contraste fueron generadas, se analizaron a través de la plataforma Trichomenet que puede visitarse en la siguiente liga <http://www.trichomenet.com/> (Pomeranz et al., 2013). Bajo esta plataforma se realizó el marcaje de tricomas de manera semi-automatizada ([figura 4C-2](#)). Sin embargo, todas las imágenes fueron revisadas visualmente en caso de que algunos no fueran registrados o de que se marcaran algunos por duplicado. Finalmente, el índice de tricomas (número de tricomas por hoja sobre el área de la hoja) se obtuvo como se describe en Gravano (1998), Tattini (2000) y Pérez-Estrada (2009).

### **3.5 Protocolo de morfometría geométrica**

En las últimas dos décadas se ha incrementado el uso de herramientas basadas en modelos matemáticos para el análisis de la forma. Estos estudios generalmente están basados en marcas y permiten cuantificar detalladamente la compleja variación de la forma (posteriormente se describirá que son las marcas). Mediante estas técnicas se ha analizado una amplia gama de modelos y atributos. No obstante, solo algunos estudios han abordado

el estudio de la plasticidad fenotípica en plantas mediante estas técnicas (Viscosi et al., 2015, Klingenberg et al., 2012). De igual forma, recientemente, se han comenzado a abordar temas relacionados al estudio del desarrollo a partir de datos con marcas (Klingenberg et al., 1998; Debat V. et al., 2000; Badyaev y Foresman, 2000).

En la presente investigación fue crucial caracterizar la forma de las hojas, así como evaluar las diferencias entre ecotipos y el cambio de la forma a través de los tratamientos. Por esto, se utilizó la herramienta de morfometría geométrica que permite cuantificar detalladamente la variación de la forma de las hojas y al mismo tiempo permite visualizar gráficamente los cambios de la misma.

La morfometría geométrica (GM) tiene como objetivo principal analizar la forma de los organismos o la forma de los atributos de los organismos. Bajo este enfoque, la forma es definida como toda la información geométrica que se mantiene a partir de una configuración de marcas, restando el efecto del tamaño, posición y orientación (Bookstein, 1997; Zelditch et al., 2004; Mitteroecker y Gunz, 2009). Para realizar un análisis morfométrico es necesario hacer uso de marcas. Las marcas son puntos colocados en sitios de importancia biológica que están continuamente presentes en todos los organismos observados y que permiten una rápida comparación de estructuras presumiblemente homólogas. Sin embargo, no todos los organismos despliegan estructuras o atributos en los que es posible colocar las marcas de manera regular e inequívoca. Estos atributos por lo general son definidos por contornos o espacios entre estructuras que aportan información relevante sobre la forma (Adams et al., 2004; Mitteroecker y Gunz, 2009; Zelditch, 2012).

La hoja de *Arabidopsis* presenta una morfología complicada, es difícil establecer claramente marcas homólogas, y por otro lado, gran parte de la información de la forma de la hoja se encuentra en el contorno. Para caracterizar el contorno de la hoja se utilizó un tipo de marcas conocidas como semi-marcas, éstas permiten marcar zonas donde la homología de puntos son difíciles de identificar (Bookstein, 1997; Zelditch et al., 2004; Sheets, 2006). El objetivo principal de las semi-marcas es obtener una buena cobertura del contorno del

objeto de estudio, apoyándose en gradillas o líneas equidistantes que se colocan digitalmente sobre el objeto y permiten recuperar la forma (Sheets, 2006).

En el presente estudio se utilizaron dos marcas por hoja: la primera marca se colocó en el sitio basal del pecíolo y la segunda marca se colocó en la zona distal del margen de la lámina ([figura 4C-1](#), puntos rojos). El contorno fue caracterizado mediante el uso de 46 semi-marcas ([figura 4C-1](#), puntos negros). Para la medición del contorno se utilizó una plantilla (conocida como peine) que permitió establecer las líneas que sirvieron de guía para marcar los espacios a lo largo del contorno de la hoja de forma equidistante (Sheets et al., 2004; Guralnick et al., 2001). La plantilla fue colocada mediante el programa MakeFan6 (Sheets, 2006) usando las dos marcas como referencia sobre la hoja. El peine trazado permitió colocar 46 semi-marcas entre la intersección de la curva de la hoja y la plantilla; todas las marcas y semi-marcas se colocaron utilizando el programa TPSdig2 (Sheets, 2006).

Finalmente, las imágenes digitalizadas con las marcas y semi-marcas fueron sometidas a un análisis generalizado de Procrustes (Ross, 2004), el cual es relevante ya que remueve las diferencias presentes en todos los individuos que pueden ser debidas a posición, rotación o escala. Este paso fue realizado en el programa MorphoJ (Klingenberg, 2012). El protocolo utilizado para realizar los análisis de morfometría geométrica puede consultarse en el [anexo 3](#).

Generalmente los estudios que utilizan técnicas de morfometría geométrica hacen uso del *tamaño* centroide como descriptor del tamaño. Este tiene como ventaja no inducir una correlación entre el tamaño y la forma (Bookstein, 1991), por lo tanto, bajo este contexto el tamaño centroide es matemáticamente independiente de la forma. El tamaño centroide (CS, por sus siglas en inglés) de una configuración (x) está dado por la siguiente fórmula:

$$CS(\mathbf{X}) = \sqrt{\sum_{i=1}^K \sum_{j=1}^M (X_{ij} - C_j)^2}$$

En dónde CS= es el tamaño centroide;  $X_{ij}$ = es la distancia de las marcas al centroide y  $C_j$ = es el centroide

Este es la raíz cuadrada de la suma de las distancias al cuadrado de las marcas (x) desde el centroide a cada marca de la configuración.

Esta medida ha sido ampliamente utilizada como valor dependiente de la forma en regresiones multivariadas para el estudio de la alometría (Monteiro, 1999, Klingenber 2005, 2006, 2008). En la presente investigación se utilizó el tamaño centroide para observar la relación entre el tamaño y la forma (Klingenberg, 2011). Asimismo se hace mención del tamaño centroide de las configuraciones de la hoja haciendo referencia al tamaño como atributo de la hoja. Este se calculó a partir del software MorphoJ.

### **3.6 Análisis estadísticos**

Como primer paso en la presente investigación, se cuantificaron las diferencias entre las formas de las hojas entre los ecotipos. Se realizó una comparación de los ocho ecotipos y se observó el espacio empírico o morfoespacio que éstas ocupan. La evaluación de este espacio consistió en la aplicación del análisis de variables canónicas (CVA por sus siglas en inglés). Este análisis permite enfatizar las diferencias entre los grupos y reducir las diferencias dentro de los grupos mediante un reescalamiento de los valores de cada una de las matrices (Klingenberg, 2010). El análisis de CVA fue realizado con el programa MorphoJ versión 2.0 (Klingenberg, 2011).

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) de las hojas de los ecotipos bajo el tratamiento de 22°C. El PCA es uno de los métodos más utilizados para explorar datos multivariados. En el contexto de morfometría geométrica es utilizado para mostrar las principales características de la variación de la forma en un conjunto de datos y también como un método de ordenación para visualizar patrones dentro de las observaciones. La significancia estadística de las formas promedio de los ecotipos fue evaluada mediante pruebas de permutación de las distancias Procrustes (10 000 permutaciones por prueba) como ha sido descrito por Klingenberg (2011). Finalmente, para ilustrar los cambios y la

variación en los tratamientos y entre ecotipos se realizaron superposiciones entre los diagramas de la forma promedio y el valor de cambio de la forma conocidos como “wireframe”. Estos diagramas permiten visualizar la variación de la forma de manera estilizada (Souza et al., 2012).

Para visualizar la intensidad y el tipo de respuesta plástica de los diferentes atributos de los ocho ecotipos de *Arabidopsis* dentro de los tratamientos se emplearon gráficas de normas de reacción. Estas consistieron en colocar a la variable independiente (tratamiento ambiental) y la variable dependiente: el valor promedio del atributo fenotípico (forma de la hoja, tamaño, número de tricomas por área, número de hojas y el índice de disección). Para estas normas se obtuvieron los valores de la regresión y la pendiente como descriptores de la plasticidad. Además, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, ya que de este análisis se derivan tres componentes que permiten describir la variación: 1) la varianza debida a los organismos, 2) la varianza debida al tratamiento, y 3) la variación debida a la interacción organismo ambiente (*OxA*) (Schlichting, 1986). De esta manera, contrastamos cual fue la principal fuente de variación en nuestro diseño experimental.

Para los datos de la forma mediante el uso de marcas se realizaron regresiones multivariadas por el método propuesto por Drake y Klingenberg (2008) desde el programa MorphoJ. Estas regresiones generan una proyección del vector de la forma (generalmente el vector del PC1), en la dirección de la variable dependiente (tratamiento), las cuales dan como resultado un porcentaje de la variable que se encuentra mayormente asociada a dicha correlación, este proceso ha sido utilizado y descrito por Klingenberg (2011) y Souza y colaboradores (2012) para evaluar los cambios de la hoja en diferentes condiciones ambientales. Es por eso que en el presente trabajo, se decidió utilizar el porcentaje de la variable asociada al PC1 como descriptor de la forma.

En la actualidad existen diferentes enfoques para medir la interacción de los organismos con el ambiente. Desafortunadamente, todos tienen dificultades operacionales o conceptuales. Los métodos más sencillos para el cálculo de la variabilidad a través de los tratamientos incluyen las desviaciones estándar, varianza, o el coeficiente de variación (desviación



estándar/ la media) de los atributos a través de los tratamientos. En el presente estudio se utilizó el coeficiente de variación de los distintos atributos como descriptor de la plasticidad desplegada por los ecotipos a través de los tratamientos para visualizar la correlación entre la plasticidad fenotípica y los valores de estacionalidad de la temperatura (indicador de la heterogeneidad ambiental).

## 4 Resultados

### 4.1 Caracterización climática del sitio de origen de los ecotipos de *Arabidopsis*

A partir de la caracterización bioclimática se observó que los ocho ecotipos seleccionados se encuentran distribuidos bajo diferentes condiciones geográficas y ambientales. Estos se distribuyen a través de distintas altitudes, siendo el ecotipo de altai-5 el que se distribuye a mayor altitud (912 m.s.n.m.), mientras que el ecotipo Kyo de Japón se distribuye a menor altitud (26 m.s.n.m.). Los datos de las 19 variables bioclimáticas para caracterizar los sitios de donde provienen los ecotipos seleccionados pueden verse en el [Anexo 2](#). Sin embargo, para la presente investigación solo fueron seleccionadas cinco variables, las cuales explican medidas de tendencia central y de dispersión para las variables de temperatura y precipitación. Estos datos pueden verse en la [tabla 3](#).

**Tabla 3.-** Información de cinco variables bioclimáticas y la altitud para los sitios de los ecotipos a partir de las bases de datos de worldclim, 2016.

Ecotipo	Altitud (msnm)	Temperatura media anual (°C)	Isotermalidad (%)	Estacionalidad de la Temperatura (%)	Precipitación media anual (mm)	Estacionalidad de la precipitación (%)
<b>Columbia (Col-0)</b>	-	12.8	31	93.21	100.5	30
<b>Cape Verdi (Cvi-0)</b>	304	<b>22.2</b>	62	14.56	36.9	150
<b>Tabor (Ta-0)</b>	567	7.1	32	69.02	68.8	36
<b>San Eleno (Se-0)</b>	222	15	37	68.59	50.2	48
<b>Altai (altai-5)</b>	<b>912</b>	<b>3.6</b>	25	136.38	16.9	33
<b>Kyoto (Kyo)</b>	<b>27</b>	15.5	28	81.75	172.7	42

<b>Ovelgoenne (Ove-0)</b>	533	8.8	32	58.00	76.1	18
<b>Shahdara (Sha)</b>	646	12.1	34	82.29	58.0	79

La región que presenta un mayor valor en la temperatura promedio anual es la de Cabo Verde (22.2°C) donde se ubica el ecotipo de Cvi-0. En contraste, el ecotipo de Altai-5 (China) se ubica en la zona más fría con una temperatura promedio anual de 3.6°C. Cabe señalar que la temperatura máxima que registra el sitio de Alemania de donde proviene el ecotipo de Ove-0 es de 21.3°C ([Anexo 2](#)). Esto es importante, pues durante el tratamiento de 25°C ningún individuo de esta población completó su desarrollo, es decir, no llegó a la floración.

Similarmente, el índice de variabilidad de la temperatura (isotermalidad) indica que los ecotipos de Altai-5 y Cvi-0 presentan una alta y baja oscilación en la temperatura, respectivamente ([tabla 3](#)). Es decir, la población de Cvi-0 se ubica en un sitio donde el intervalo de la temperatura diurna es igual al intervalo de temperatura anual. En contraparte, el ecotipo de Altai-5 se ubica en un sitio donde el rango de la temperatura diurna es la mitad del intervalo de la temperatura anual. Así mismo, los valores de estacionalidad de la temperatura confirman que la población que presenta mayor variación en la temperatura promedio por mes es Altai-5 y el de menor variación fue el de Cvi-0. En resumen, el sitio donde se distribuye Altai-5 presenta mayor variabilidad en la temperatura promedio mensual, mientras que el ecotipo de Cvi-0 presenta condiciones constantes durante los meses.

Por otra parte, la variable de precipitación exhibe diversos contrastes para los sitios de donde provienen los ecotipos. El ecotipo de Kyo ubicado en Japón presenta la mayor precipitación media anual con 172.7 mm., mientras que Altai-5 presenta el valor promedio más bajo con 16.9 mm. Por otro lado, cvi-0 presenta el mayor porcentaje de variación (estacionalidad) en la precipitación, mientras que el ecotipo de Ove-0 presenta la menor variación de la precipitación. Es decir, Cvi-0 se ubica en un sitio donde la precipitación presenta cambios abruptos en la precipitación a lo largo del año, mientras que Ove-0 se ubica bajo un régimen de precipitación constante.

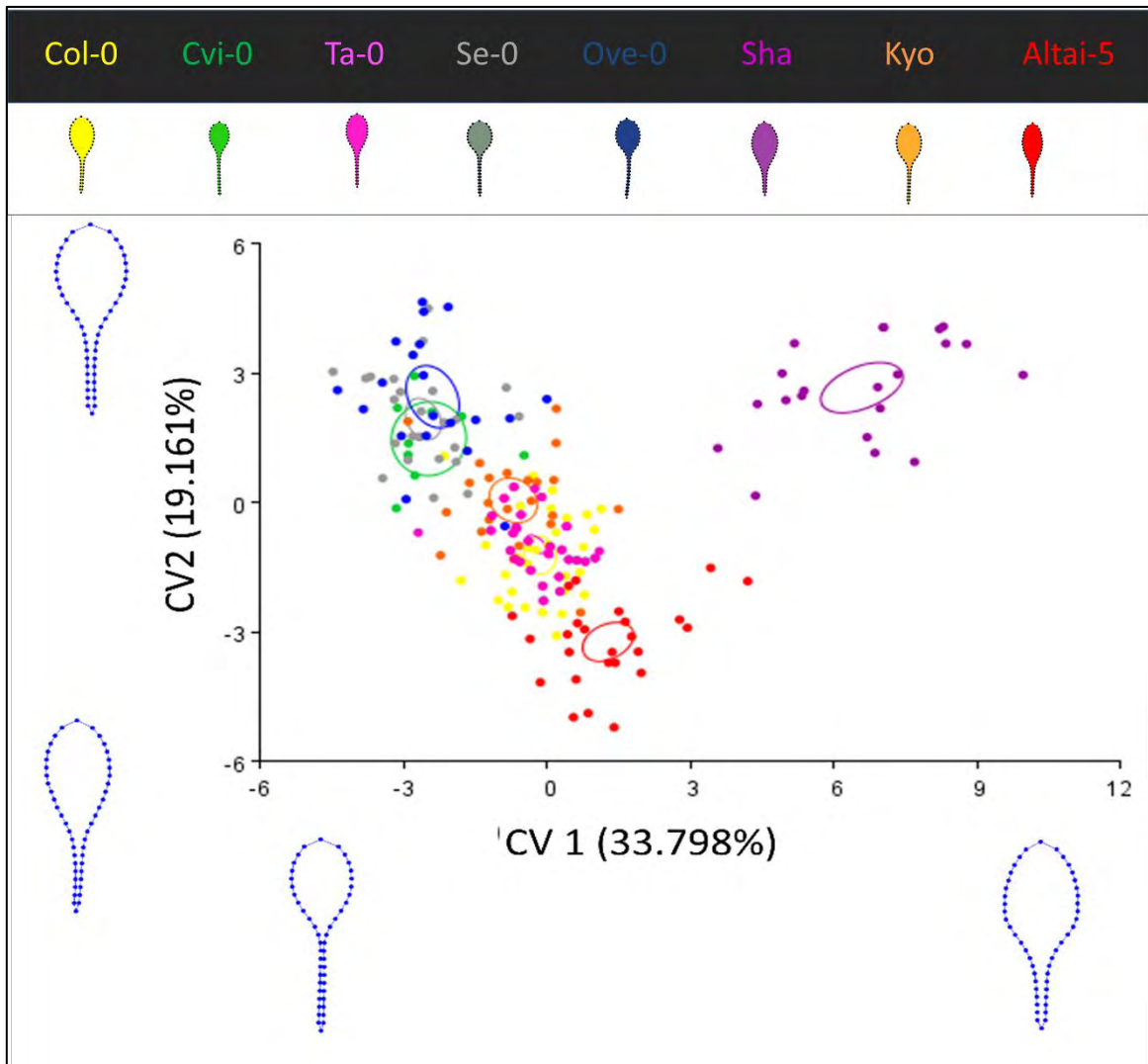
## 4.2 Variación natural en la morfología de la hoja de *Arabidopsis*

Los resultados de los análisis de variables canónicas (CVA) y el de componentes principales (PCA) se obtuvieron a partir de los ocho ecotipos que fueron expuestos bajo la temperatura de referencia (22°C). Estos análisis se realizaron con una  $n$  total de 244 observaciones. A partir de estos resultados, se caracterizó las diferencias en la forma de las hojas entre las poblaciones de *Arabidopsis*. Se estableció un código de colores por ecotipo, con el fin de visualizar de forma sencilla los resultados que se muestran en las siguientes secciones ([figura 5](#)).



**Figura 5.** Forma promedio de la sexta hoja de los ecotipos de *Arabidopsis*. Los colores indican las clasificaciones establecidas para visualizar de manera sencilla los resultados.

El resultado del análisis de variables canónicas generó un morfoespacio donde algunos ecotipos presentan traslapes parciales. Sin embargo, entre algunas poblaciones se observan claras diferencias en el espacio ocupado. La primer variable canónica explica el 33.79% de la variación entre grupos y permite discriminar la forma entre el ecotipo de Sha y el resto de los ecotipos. Particularmente, las formas que más contrastan en este eje son la de Sha y la de Cvi-0. Las diferencias de la forma asociadas a esta variable están relacionadas al tamaño relativo de la lámina, así como con el alargamiento del peciolo. Estos cambios permiten discriminar a los ecotipos con hoja en forma de cuchara o “cupshaped” como lo es Cvi-0 y hojas con formas ovaladas como las de Sha, ver en [figura 6](#).



**Figura 6.** Morfoespacio ocupado por las hojas de los ocho ecotipos de *Arabidopsis* generado por el CVA. Los diagramas “wireframe” (líneas azules punteadas) están asociados al CV1 y CV2 (52.959% de la varianza total). Las elipses de confianza representan el promedio de los ecotipos con probabilidad del 90%.

Por otro lado, la variable canónica dos (CV2) explica el 19.16% de la variación y se encuentra asociada con diferencias en la expansión de la zona distal de la lámina foliar y a cambios en la expansión de la zona media de la lámina foliar o la zona de unión entre la lámina y el peciolo. Sobre este eje es posible ver diferencias significativas entre el ecotipo de Altai-5 y los ecotipos de Sha, Ove-0, Se-0 y Cvi-0. En total, estas dos variables canónicas explican el 52.95% de la variación entre grupos y permiten discriminar a los ecotipos a partir de estas diferencias. Las distancias Procrustes entre ecotipos fueron significativas en la mayoría de

las comparaciones por pareja, con excepción de los ecotipos de Col-Kyo, Se-0 – Cvi y Se-0 – Ove-0. Es decir, estos ecotipos presentan mayor grado de traslape o similitud en el espacio morfométrico ([tabla 4](#)).

**Tabla 4.-** Diferencias en la forma de la hoja entre los ocho ecotipos de *Arabidopsis* en condiciones de crecimiento estándar. Distancias Procrustes calculadas a partir del CVA de una matriz de 244 observaciones. La significancia de las distancias entre poblaciones se calculó utilizando una prueba de permutación (10 000 iteraciones) mediante el programa MorphoJ (Klingenberg, 2011). *P*-values (\*\*\*) altamente significativos ( $p < 0.001$ ).

ecotipo	Altai-5	Col-0	Cvi-0	Kyo	Ove-0	Se-0	Sha
<b>Col-0</b>	0.0447* **						
<b>Cvi-0</b>	0.1049* **	0.1175** *					
<b>Kyo</b>	0.0542* **	0.0215	0.1063** *				
<b>Ove-0</b>	0.0808* **	0.0721** *	0.0671** *	0.0576** *			
<b>Se-0</b>	0.0847* **	0.0886** *	0.0369	0.0751** *	0.0381		
<b>Sha</b>	0.0955* **	0.0879** *	0.1879** *	0.1042** *	0.1525** *	0.1651** *	
<b>Ta-0</b>	0.0372* **	0.0384** *	0.0835** *	0.0333	0.056***	0.0573** *	0.1119** *

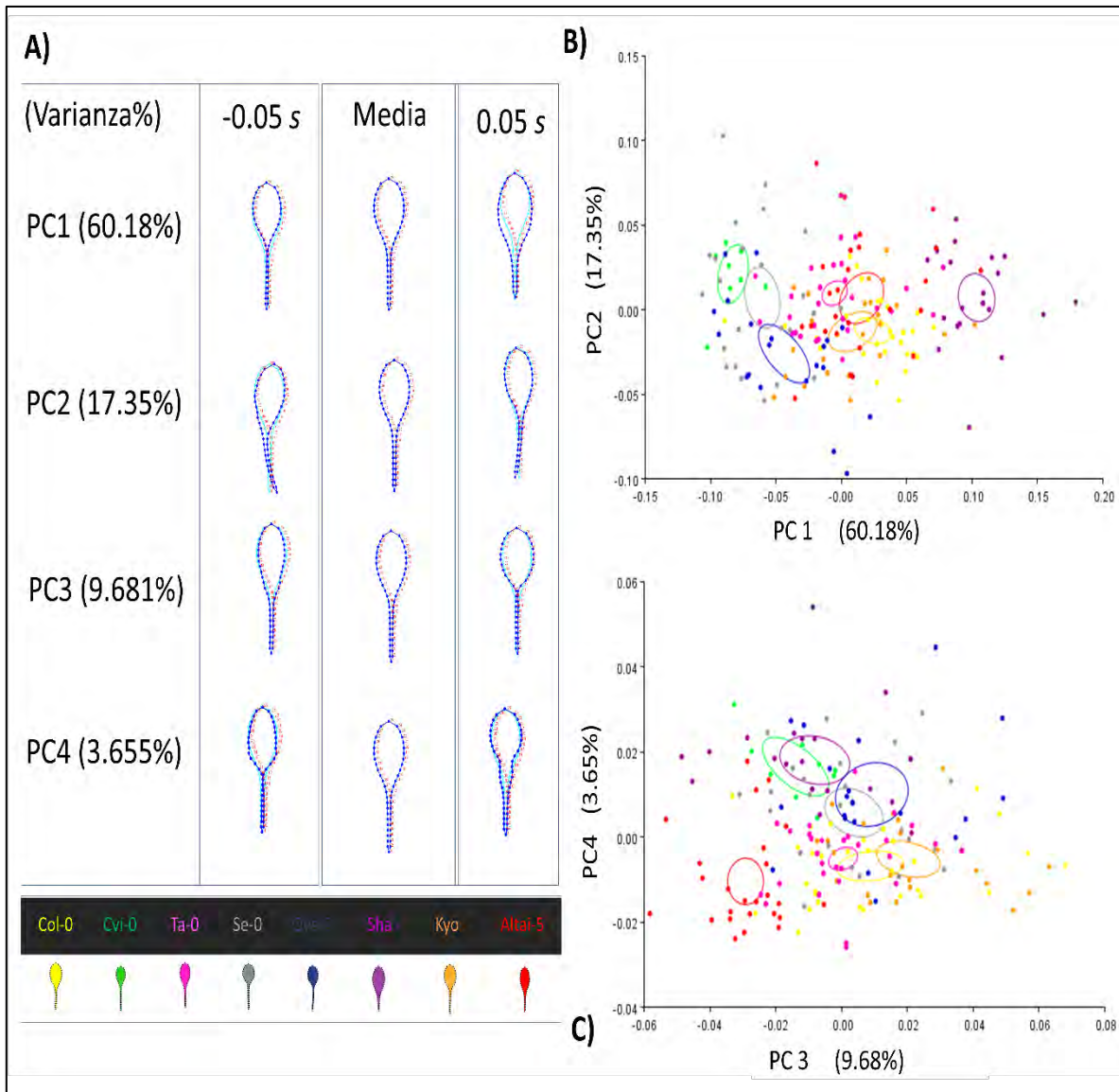
Los primeros cuatro componentes principales explican el 90,87% de la variación total de la forma de la hoja ([tabla 5](#)). Las variaciones de la forma expresadas por los cuatro componentes principales (PC) se muestran en la ([figura 7](#)). El PC1 explica el 60.18% de la varianza y, al igual que la primera variable canónica, explica cambios en la sección media de la lámina relacionados a hojas con forma de cuchara y formas ovaladas. Es decir, sobre este componente se observan las mayores diferencias entre las formas de los ecotipos, particularmente entre los ecotipos de Cvi-0 y Sha ([figura7A; PC1](#)). Es importante señalar que este eje es el principal descriptor de la diferencias de la forma entre ecotipos, por tal motivo este fue utilizado como descriptor de la forma. En adelante cuando se menciona el atributo de la forma, se hace referencia al valor de la forma descrito por el PC1.

**Tabla 5.** Las principales cuatro variables de la forma de la hoja en los ocho ecotipos de *Arabidopsis*, a partir del análisis de Componentes Principales (PCA).

<b>Componentes Principales</b>	Eigenvalores	% varianza	Acumulado %
<b>PC1</b>	0.00320365	60.18	60.18
<b>PC2</b>	0.00092399	17.357	77.537
<b>PC3</b>	0.00051534	9.681	87.218
<b>PC4</b>	0.0001946	3.655	90.873

El segundo componente principal representa el 17.36% de la variación y se encuentra asociado a cambios en la orientación del peciolo, así como con un ligero incremento en la parte superior de la lámina foliar. Este eje es el segundo componente más importante, pero este no permite separar fácilmente los grupos y observar diferencias biológicamente significativas ([figura 7A; PC2](#)).

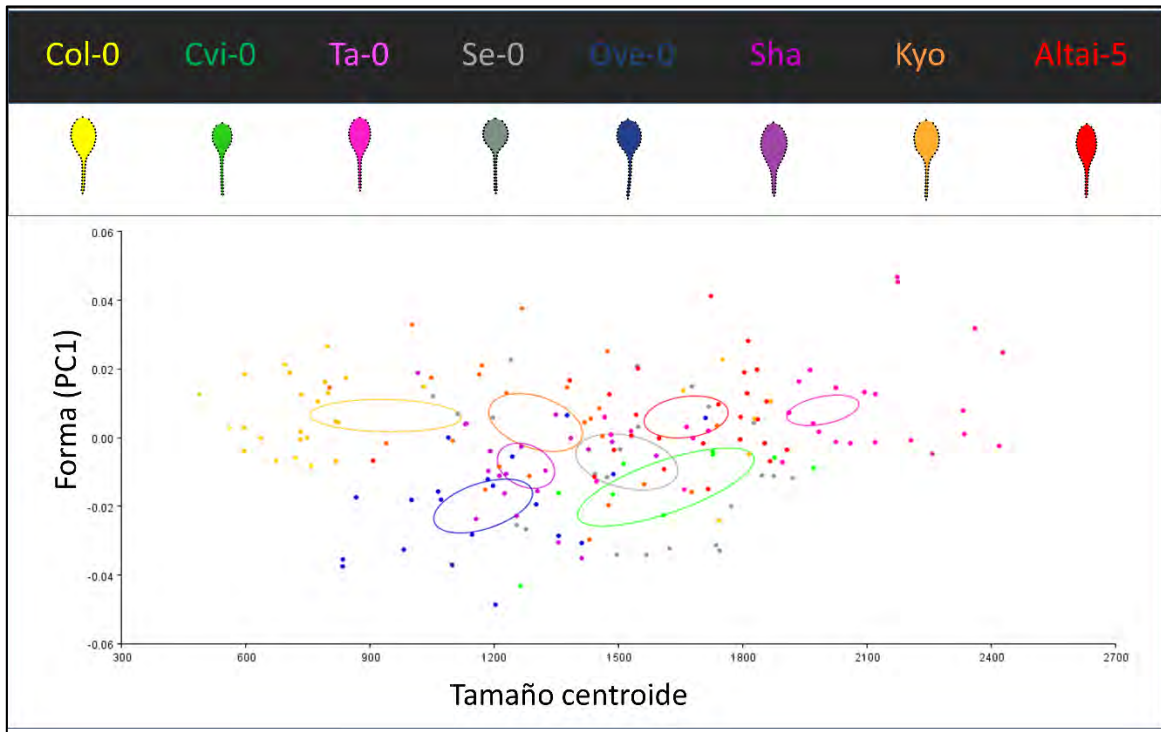
El tercer componente principal contiene el 9.68% de la varianza y explica principalmente modificaciones en la zona de unión de la lámina y el peciolo, este cambio puede relacionarse principalmente a la presencia-ausencia de lóbulos. Bajo este eje, es posible observar diferencias entre los ecotipos de Altai-5, Col y Kyo ([figura 7A; PC3](#)). Finalmente, el cuarto componente principal explica el 3.66% de la varianza. A partir de este componente se observa una correlación en la modificación del peciolo y un incremento de la base de la lámina, permitiendo así observar diferencias entre los ecotipos de Altai-5, Kyo y Sha con el resto de los ecotipos ([figura 7A; PC4](#)).



**Figura 7.-** Variación de la forma de la hoja de los ocho ecotipos bajo la temperatura estándar de 22°C. **(7A)** Imágenes completas de la forma promedio y las desviaciones estándar en los primeros cuatro componentes principales. Las desviaciones son calculadas a partir del promedio de la muestra, multiplicada por los valores de los coeficientes de los componentes principales (eigenvectores). **(7B)** Gráfica de dispersión de los componente 1 y el componente 2. **(7C)** Gráfica de dispersión de los componentes 3 y 4. Los cuales en total explican el 90.87% de la varianza. Cada punto en la gráfica representa un organismo de la muestra. Las elipses de confianza representan el promedio de las observaciones con un 0.9 de probabilidad.

Los resultados de la regresión alométrica de forma y tamaño son de un 5.66% de predicción, con un valor de  $P$  de 0.0002, lo cual indica que no existe una fuerte relación entre la forma de los ecotipos y el tamaño que estos alcanzan. No obstante, en la [figura 8](#) se puede observar que las hojas de Col presentan un tamaño centroide menor entre los organismos

de la muestra, mientras que el ecotipo Ta-0 presenta un mayor tamaño. El resto de los ecotipos presentó valores similares en el tamaño de las configuraciones.



**Figura 8.-** Regresión alométrica entre la forma-tamaño de los ocho ecotipos bajo la temperatura de referencia. Las elipses representan el promedio de las observaciones con un intervalo de confianza de 0.9.

#### 4.3 Relación entre la forma y el tamaño de las hojas con las variables bioclimáticas del sitio de origen de los ecotipos

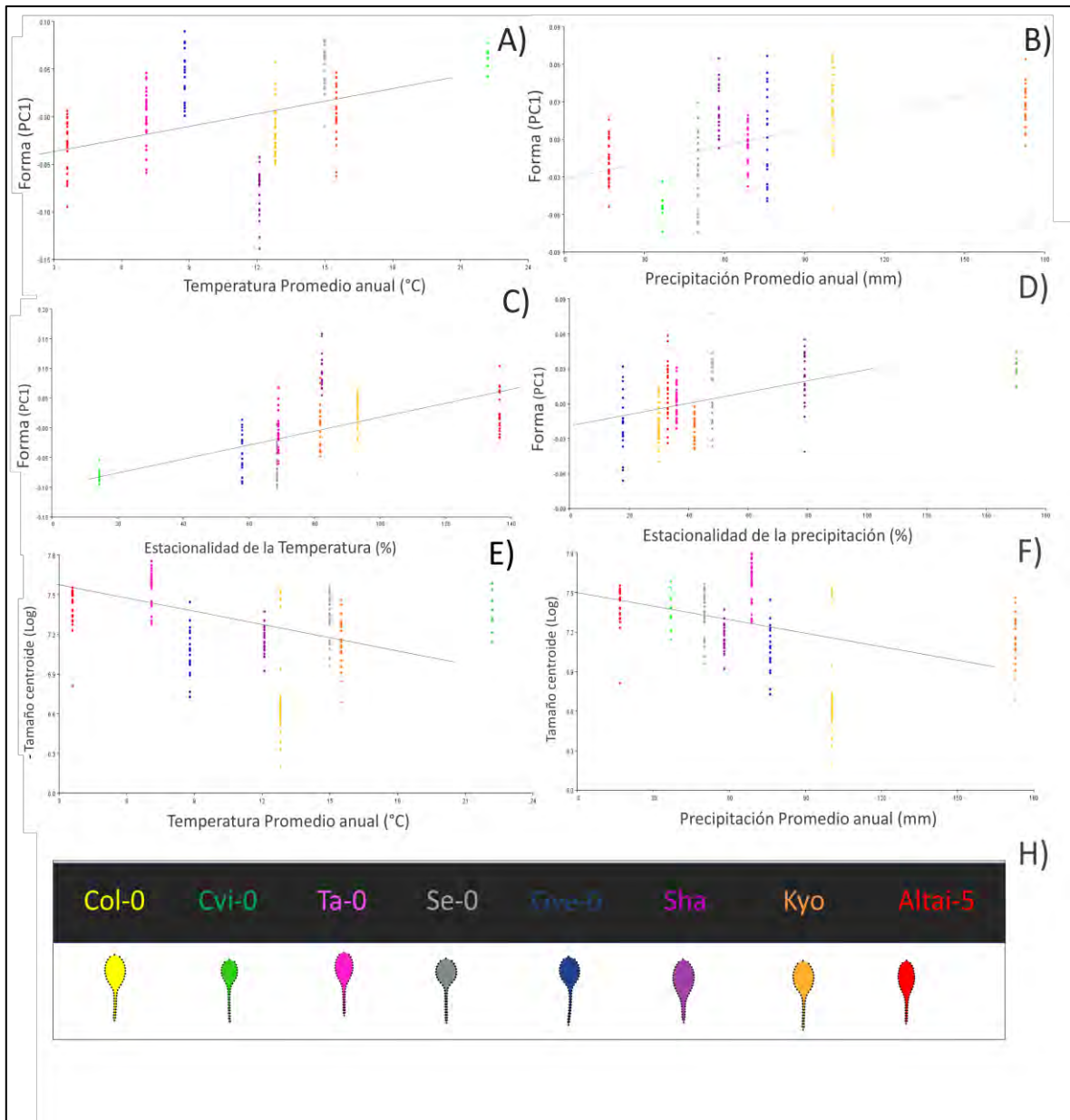
El resultado de la evaluación de la relación entre la forma y el tamaño de las hojas con algunas variables bioclimáticas, permite observar correlaciones positivas entre forma de la hoja con los valores de isothermalidad y de estacionalidad de la temperatura. Sin embargo, no se encontraron relaciones con los descriptores del MAT y el MAP como se esperaba. Por otro lado, el tamaño del centroide presenta una relación positiva con las variables del MAT y el MAP, pero no presenta relación con el resto de las variables. Las gráficas de estas correlaciones pueden verse en la [figura 9](#) y los valores en la [tabla 6](#). Es importante mencionar, que el ecotipo de Sha modifica la correlación entre la variable del MAT y la



forma. Es decir, cuando se excluye a este ecotipo de la regresión el valor de la predicción aumenta y permitiría explicar el traslape de las formas entre los ecotipos que presentan condiciones ambientales similares.

**Tabla 6.-** Correlaciones entre la forma y tamaño de la hoja y las variables bioclimáticas.

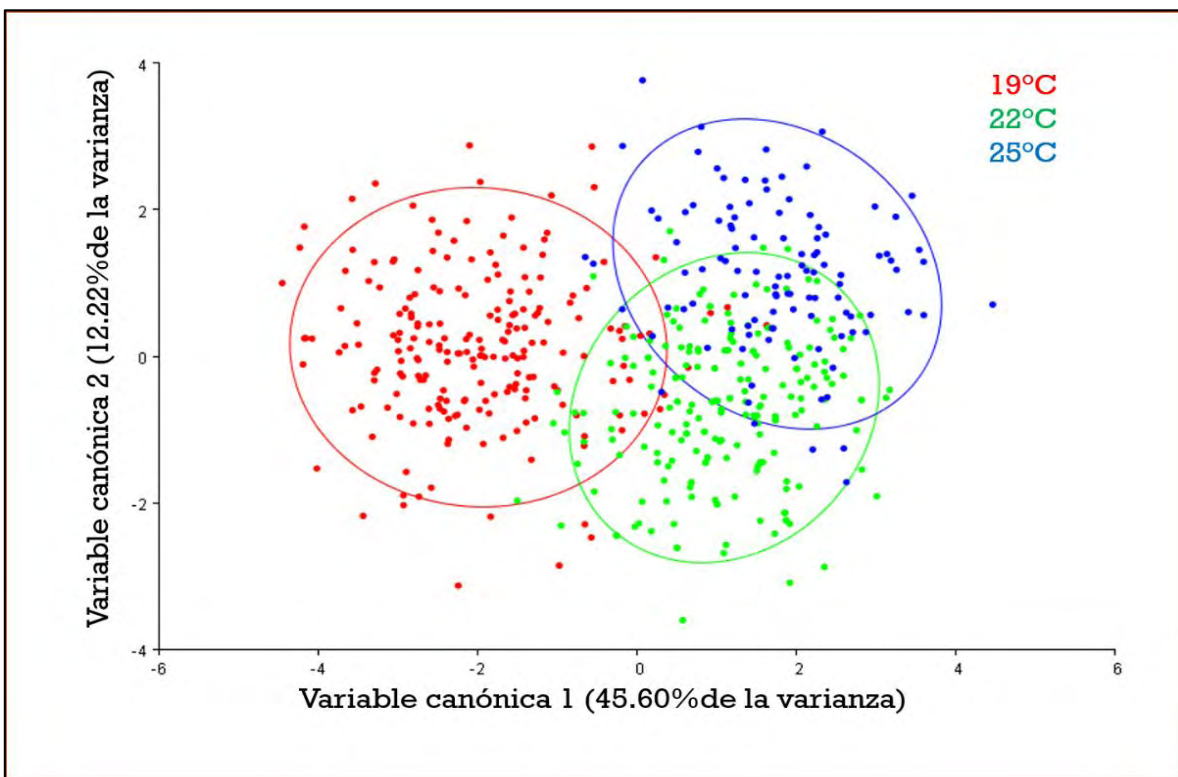
Gráfica	Variable ambiental	Forma de la hoja		Gráfica	Tamaño	
		%predicción	Pvalue		%predicción	Pvalue
A	Temperatura media anual (MAT)	3.3%	0.0005	E	13.9%	<.0001
	Isotermalidad	9.1%	<.0001		0.2%	0.5107
C	Estacionalidad de la temperatura	11.4%	<.0001		0.9%	0.1620
B	Precipitación media anual (MAP)	4.4%	0.0002	F	10.1%	<.0001
D	Estacionalidad de la precipitación	1.8%	0.0157		0.1%	0.5799



**Figura 9.-** Correlaciones entre los atributos de forma y tamaño del centroide con las variables bioclimáticas seleccionadas. En las presentes gráficas el valor de la forma es el valor del PC1 que explica el 60.2% de la varianza. **A)** Relación de la forma y temperatura media anual. **B)** relación entre la forma y la precipitación promedio anual, **C)** relación de la forma y la estacionalidad de la temperatura, **D)** relación de la forma y estacionalidad de la precipitación, **E)** relación del tamaño del centroide y la temperatura promedio anual, **F)** relación del tamaño del centroide y la precipitación promedio anual. Los valores de las correlaciones pueden observarse en la [Tabla 6](#).

#### 4.4 Plasticidad fenotípica de la hoja en los diferentes ecotipos de *Arabidopsis*

Una vez concluidos los tratamientos, se realizó un CVA con el fin de visualizar el cambio de las poblaciones ante el cambio de temperatura. Interesantemente, los resultados permitieron observar que los cambios de la hoja de *Arabidopsis* pueden contrastarse mejor a partir de los tratamientos ambientales que por las características intrínsecas por ecotipo. En la [figura 10](#) puede observarse que las diferencias son mayores entre los tratamientos de 19 °C y 25°C, mientras que a 22°C se observan traslapes con el resto de los tratamientos.



**Figura 10.-** Morfoespacio utilizado por los ocho ecotipos bajo los tres tratamientos. Las elipses representan un 99% en el intervalo de confianza.

##### 4.4.1 Forma y tamaño de la hoja

Los resultados de las normas de reacción entre los valores de la forma y los tratamientos muestran que todos los ecotipos respondieron plásticamente a los tratamientos, exhibiendo modificaciones en la forma de la hoja bajo los tratamientos ambientales. Por el contrario,

los valores del tamaño del centroide no presentaron cambios significativos a través de los tratamientos (con excepción del ecotipo de Ove-0, el cual solo se desarrolló en los tratamientos de 22°C y 19°C y no generó el mismo número de individuos para comparar dicha relación). Las normas de reacción correspondientes pueden verse en la [figura 11](#) y los resultados de las regresiones en la [Tabla 7](#).

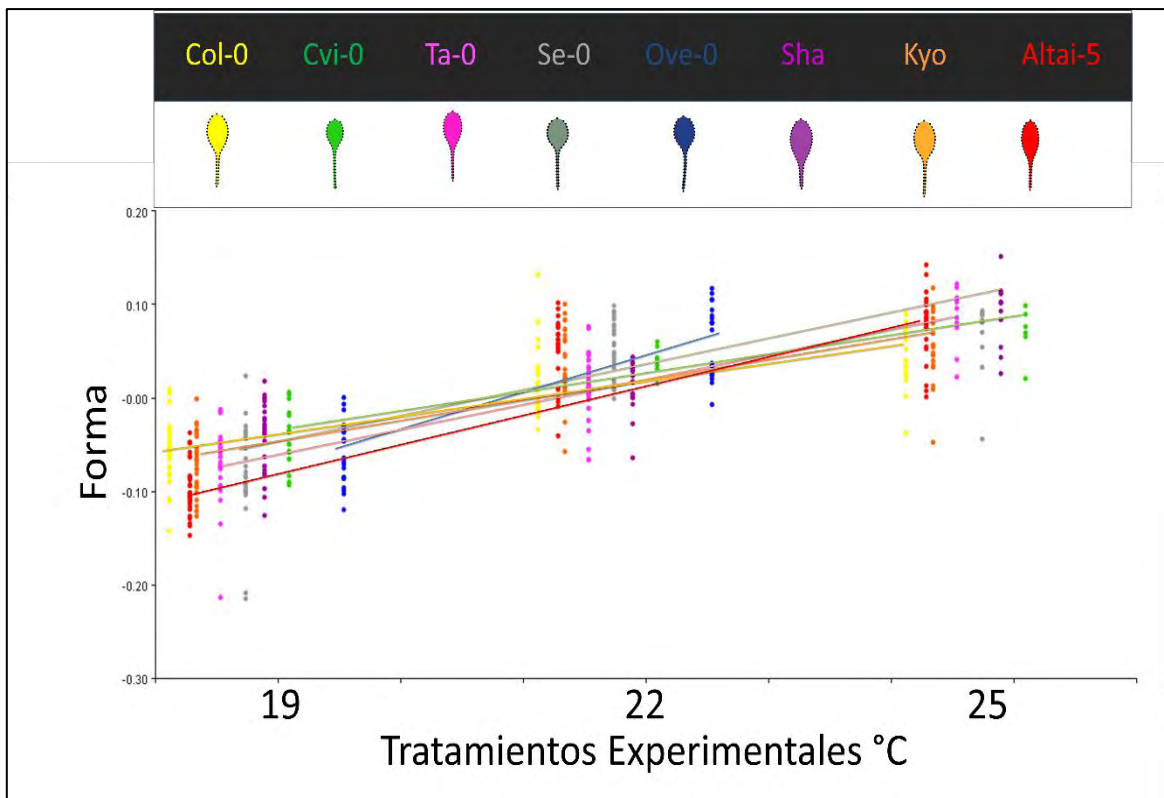
**Tabla 7.-** valores de la regresión de las normas de reacción de tamaño y forma por ecotipo.

Ecotipo	Forma de la hoja		Tamaño	
	% predicción	<i>P</i> value	% predicción	<i>P</i> value
Col	31.8%	<.0001	3.4%	0.1108
Kyoto	46.2%	<.0001	1.9%	0.2502
Cvi-0	75.6%	<.0001	1.9%	0.3421
Ta-0	53.2%	<.0001	2.6%	0.1921
Altai-5	60.3%	<.0001	1.3%	0.2954
Se-0	41.4%	<.0001	3.2%	0.1636
Sha	49.0%	<.0001	3.8%	0.1207
Ove-0	57.4%	<.0001	45.6%	<.0001

A partir de las normas de reacción de la forma de la hoja de las ocho poblaciones se pueden observar dos características asociadas a los tratamientos experimentales. La primera es que la mayoría de los ecotipos presentaron una tendencia a mostrar valores bajos de la forma bajo el tratamiento de 19°C, los cuales están asociados al incremento en la zona media de la lámina (valores asociados al PC1). En contraparte, los ecotipos bajo la temperatura de 25°C presentaron una reducción en el tamaño relativo de la zona media de la lámina.

Vale la pena señalar que los ecotipos de Altai-5 y Cvi-0 presentaron los valores más altos en la respuesta al tratamiento ambiental. Esto quiere decir, que fueron los que presentaron un cambio mayor en la forma promedio bajo los tratamientos. Sin embargo, no necesariamente fueron los más plásticos, pues la plasticidad al ser descrita mediante el coeficiente de variación, indica que estos valores, no varían drásticamente entre los tratamientos. Estos ecotipos provienen de los sitios con las temperaturas promedio anual

más contrastantes de la muestra, así como de la zona con mayor y menor estacionalidad en la temperatura respectivamente. En contraparte, el ecotipo de Col-0 presentó el valor más bajo en la regresión, indicando que este ecotipo es el que menos cambios en la forma de la hoja exhibe. Esto es relevante en términos prácticos, debido a que comúnmente éste es utilizado bajo una amplia gama de tratamientos como organismo de referencia. Además, a partir de esta observación, puede especularse sobre el posible efecto de su constante reproducción en condiciones de laboratorio.



**Figura 11.-** Normas de Reacción de la forma de los distintos ecotipos bajo los tratamientos ambientales. Es importante señalar que esta regresión ocupa el valor del primer componente principal que explica el 69.6% de la varianza.

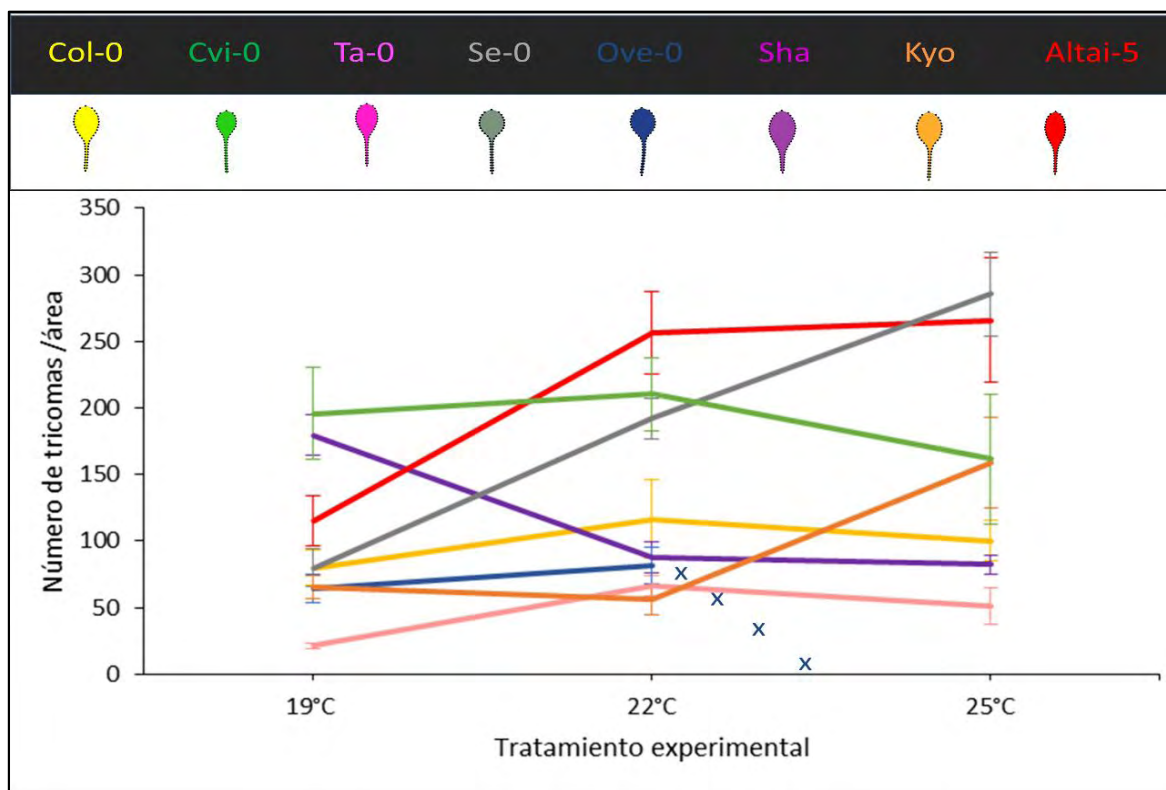
#### 4.4.2 Tricomas

El número de tricomas por área foliar presentó mayores diferencias entre ecotipos que por tratamiento. El resultado del ANOVA de 2 vías permitió confirmar que existe una ligera interacción organismo-ambiente ( $f$  11.34), mientras que la mayor parte del cambio se debe

a las diferencias entre ecotipos ( $f$  65.58) y otra parte se debe al tratamiento ambiental ( $f$  27.52). Esto es interesante, pues es un atributo que permite diferenciar a las poblaciones.

En general no se observaron tendencias claras como las mostradas en las normas de reacción de la forma de las hojas. Sin embargo, los resultados de la regresiones indican que los ecotipos de Sha, Altai-5, Se-0, Ove-0 y Kyo presentan cambios positivos con el incremento de la temperatura. Es decir, presentan un mayor número de tricomas en temperaturas más cálidas. En contraste, el ecotipo de Cvi-0 presenta una reducción en el número de tricomas bajo el tratamiento de 25°C ([figura 12](#)), mientras que Ta-0 y Col, no presentaron cambios significativos entre los tratamientos.

Al igual que los resultados de las normas de reacción de la forma, el ecotipo de Col-0 presentó el valor más bajo en la regresión. En las gráficas de norma de reacción de tricomas se observa un menor número de tricomas bajo el tratamiento de 19°C, posiblemente esto se deba a la normalización del número de tricomas por área foliar.

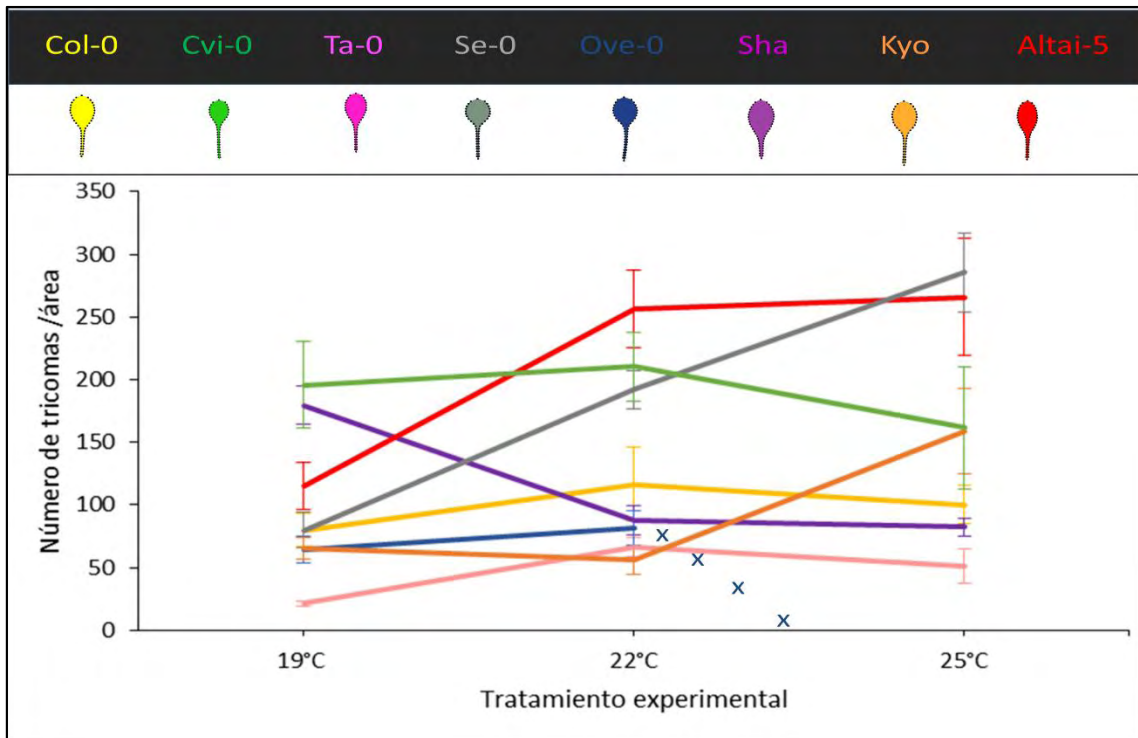


**Figura 12.-** Normas de reacción del número de tricomas bajo los tratamientos experimentales. Las barras de error representan el error estándar (ver intervalos de error [anexo 6](#)). Las equis en el ecotipo de Ove-0 marcan que ningún organismo de este ecotipo se registró.

#### 4.4.3 Índice de disección.

Una medida utilizada para describir la complejidad de la hoja es el índice de disección (Gianoli y González, 2005; Nicotra et al., 2008, Kimura et al., 2008), el cual fue previamente descrito en la sección de métodos. Generalmente este índice está asociado a la complejidad y lobulación de los bordes de las hojas. Nuestros resultados indican que los ecotipos de altai-5 y Sha muestran altos valores bajo la temperatura de 19°C. Sin embargo, este último presenta cambios drásticos durante el resto de los tratamientos. En general, altos valores en el índice describen un mayor número de lóbulos (mayor complejidad en la hoja) y valores bajos o cercanos al 0, están relacionados a contornos simples. Por esta razón, se esperaría que los ecotipos que presentan mayor lobulación en el margen de la hoja como Altai-5 y Sha obtuvieran valores superiores respecto al resto de los ecotipos y particularmente contra el ecotipo de Cvi-0 que presenta una hoja simple y un pecíolo alargado. Estos resultados se cumplen únicamente para los ecotipos de Altai-5 y Sha bajo la temperatura de referencia, pero estos valores no se mantienen en todos los tratamientos. Estos resultados concuerdan con lo observado en el PC3 del análisis de componentes principales, siendo estos dos ecotipos los que presentan mayor lobulación. Las imágenes con la forma de la hoja pueden verse en el [anexo 4](#).

De igual manera se esperaba que el ecotipo de Cvi-0 presentara el valor más bajo durante todos los tratamientos ya que este presenta una morfología simple, con una pequeña lamina y un pecíolo alargado. No obstante, el ecotipo de Cvi-0 no presentó los valores más bajos a través de los tratamientos. En general, la mayoría de los ecotipos presentaron valores bajos en el índice de disección bajo el tratamiento de 25°C en comparación con el tratamiento de 19°C. Sin embargo, ecotipos como Kyo y Col-0 presentaron incrementos significativos en 22°C, pero similares a los registrados en 19°C ([figura 13](#)).

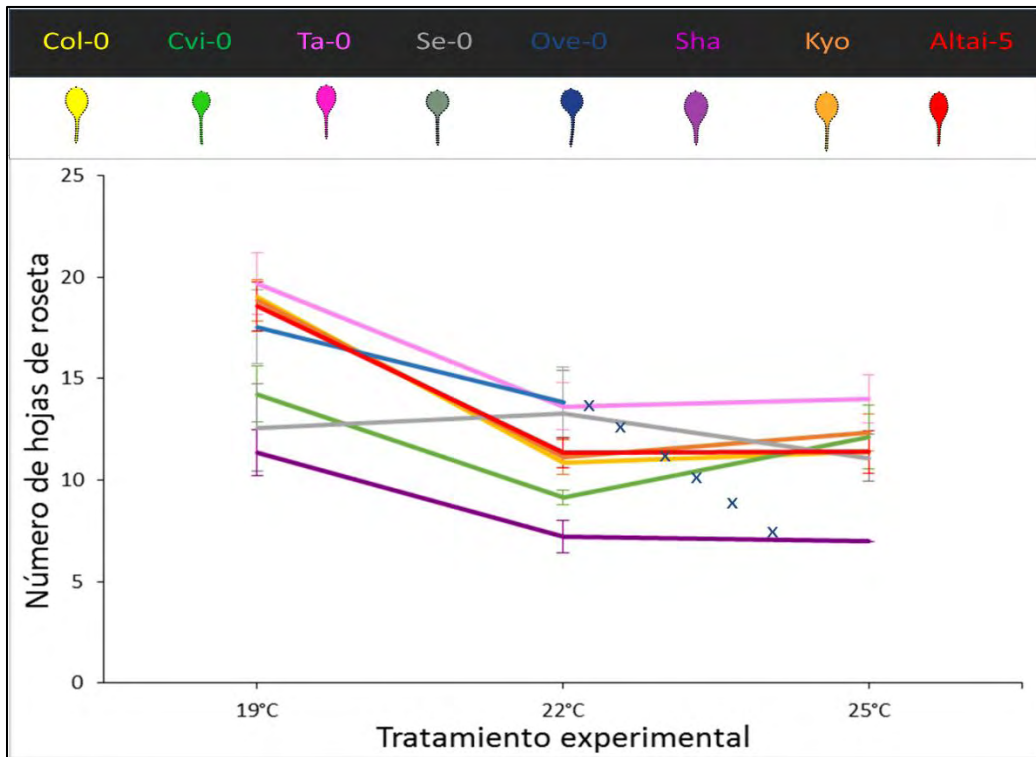


**Figura 13.-** Norma de reacción para el índice de disección bajo los tratamientos ambientales, las barras representan el error estándar (ver intervalos de error [anexo 6](#)). Las equis en el ecotipo de Ove-0 marcan que ningún organismo de este ecotipo se registró.

#### 4.4. 4 Número de hojas por ecotipo

Las normas de reacción en el número de hojas de roseta producidas bajo los tratamientos mostraron que existe una alta interacción entre organismo-ambiente ( $f$  63.79). Siendo la mayor parte del cambio debido al tratamiento ( $f$  1209.34). Así mismo, parte de la varianza puede explicarse por la variación dentro de los ecotipos ( $f$  81.19). En general, el número de hojas producidas bajo la temperatura de 19°C es mayor a la del resto de los tratamientos. Sin embargo, el ecotipo de Cvi-0 presentó un incremento en la producción de hojas bajo el tratamiento de 25°C a comparación del tratamiento de 22°C. El ecotipo que presentó mayor número de hojas bajo los tres tratamientos fue el de Ta-0. Por el contrario, Sha presentó el menor número de hojas. Las normas de reacción del número de hojas de roseta para cada ecotipo bajo los tratamientos se pueden observar en la [figura 14](#). Igualmente, se puede realizar una inspección visual en el cambio del número de hojas en el [Anexo 4](#).





**Figura 14.-** Norma de reacción del número de hojas de roseta bajo los distintos tratamientos ambientales. Las barras de error representan los valores del error estándar típico. Las equis en el ecotipo de Ove-0 marcan que ningún organismo de este ecotipo se registró.

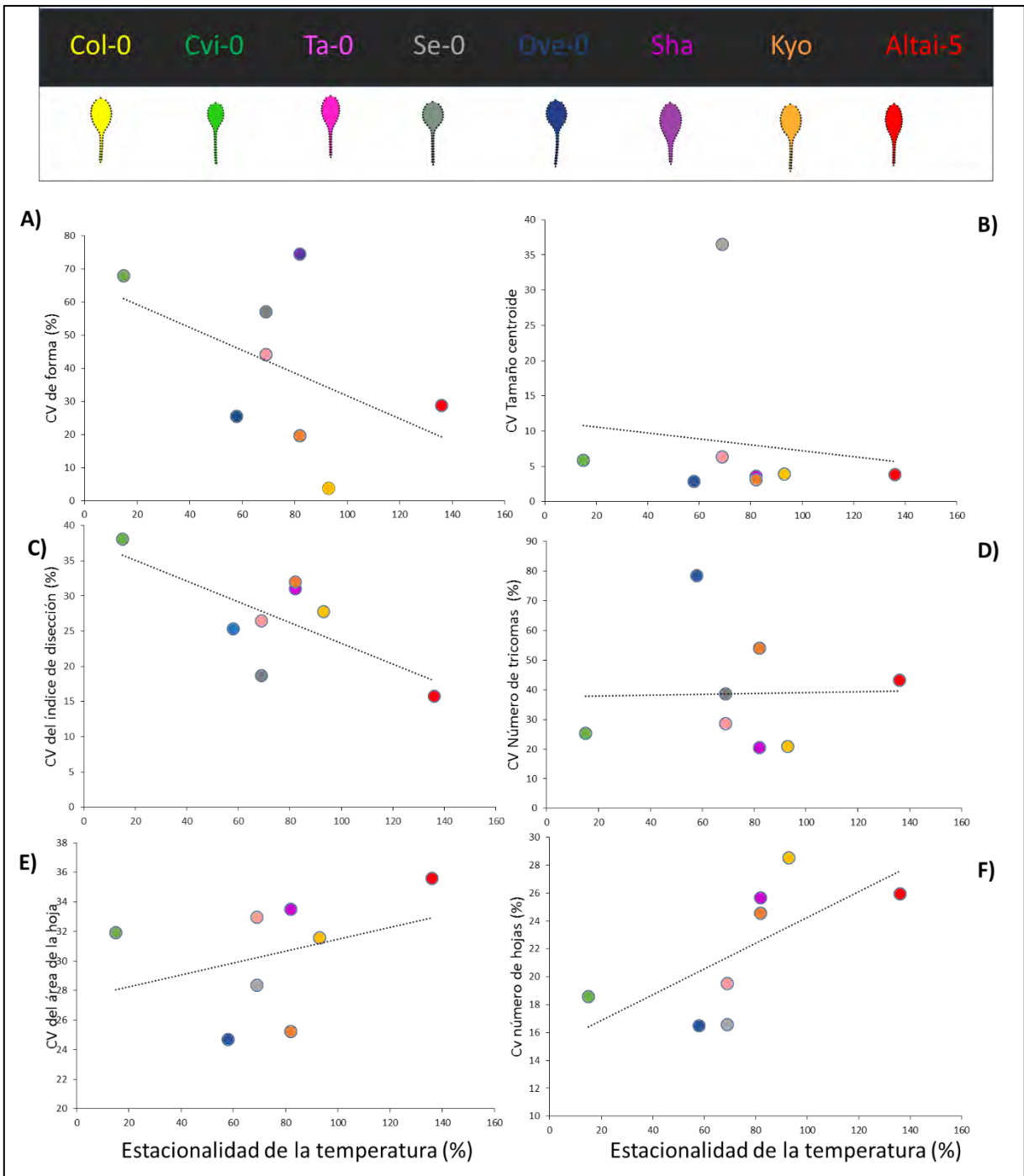
#### 4.5 Relación de plasticidad y heterogeneidad ambiental

Para poner a prueba la relación entre los valores de plasticidad y la heterogeneidad ambiental, se evaluaron las correlaciones de los valores de la estacionalidad de la temperatura y los valores de los coeficientes de variación de los distintos atributos observados bajo los diferentes tratamientos ambientales. Se utilizaron los coeficientes de variación porque estos fueron empleados como indicadores de la plasticidad en la investigación realizada por Lind y colaboradores (2007).

**Tabla 8.-** Correlaciones entre los coeficientes de variación de los distintos atributos y el coeficiente de variación de la temperatura (estacionalidad de la temperatura).

Figura 15	Correlación	Coeficiente de correlación múltiple	$R^2$	$t$	$p$ value
A	Cv forma	0.471	0.2224	-1.30	0.238
B	CV tamaño	0.123	0.0152	-0.304	0.770
C	CV índice de disección	0.694	0.4821	-2.363	0.056
D	CV tricomas	0.025	0.0006	0.062	0.952
E	CV área	0.471	0.119	0.900	0.402
F	CV número de hojas	0.665	0.4432	2.185	0.071

Los resultados que se esperaban eran los siguientes: poblaciones que presentaran mayor estacionalidad en la temperatura como son los ecotipos de Col-0 y principalmente el ecotipo de Altai-5 presentarían mayores valores en los intervalos plásticos. En contraparte, esperábamos que el ecotipo de Cvi-0 presentara menores valores en las respuestas plásticas debido a que este se ubica en la zona más homogénea. Asimismo, esperábamos que el resto de las poblaciones presentaran valores similares en las respuestas plásticas ya que compartían valores similares en la estacionalidad de la temperatura (los ecotipos de Ta-0, Se-0 y Ove-0, así como Kyo y Sha).



**Figura 15.-** Correlaciones entre los valores de los coeficientes de variación (CV) de los distintos atributos y la heterogeneidad ambiental (estacionalidad de la temperatura). **A)** CV de la forma, **B)** CV del tamaño centroide, **C)** CV del índice de disección, **D)** CV del número de tricomas, **E)** CV del área de la hoja, **F)** CV del número de hojas.

Los resultados de estas correlaciones se pueden observar en la [figura 15](#) y en la [tabla 8](#). Estos resultados sugieren que atributos como la forma de la hoja y el índice de disección se correlacionan de manera negativa con nuestras medidas de heterogeneidad ambiental. Por otro lado, los atributos como el número de tricomas, el tamaño del centroide y el área de la hoja presentaron una falta de relación con la estacionalidad de la temperatura. Sin embargo, el único atributo que presenta una correlación positiva es el número de hojas.

## 5.0 Discusión

En general los resultados obtenidos a partir de la evaluación cuantitativa de la forma mediante técnicas de morfometría geométrica permiten confirmar parcialmente una de las predicciones esperadas en la hipótesis. Las poblaciones de *Arabidopsis* presentan distintas morfologías en sus hojas de roseta, asociadas a las distintas condiciones geográficas-ambientales de las que provienen. Por otro lado, los resultados no permiten confirmar por completo lo esperado en la hipótesis central. Es decir, los ecotipos de *Arabidopsis* ubicados en sitios con mayor variación ambiental (estacionalidad de la temperatura), no presentaron mayores intervalos plásticos en comparación con los ecotipos que se ubican en sitios con menor variación. Por el contrario, se encontraron correlaciones negativas entre la plasticidad de los atributos y la estacionalidad de la temperatura. Estos resultados y su posible interpretación se discuten con mayor detalle a continuación para cada atributo.

### 5.1 Morfología de las hojas

La evaluación morfométrica mediante los análisis de CVA y PCA ofreció una valoración cuantitativa parcial de las similitudes y diferencias entre las formas de las hojas ([figura 5](#)). Este conjunto de poblaciones despliega un abanico morfológico que va desde formas comprimidas de la lámina foliar en forma de “cuchara” y con peciolo alargados, hasta formas amplias en la zona media de la lámina y con reducción en la longitud del peciolo, es

decir, formas similares a las hojas caulinares en plantas rosetófilas ([figura 6 y 7](#)). No obstante, algunas poblaciones presentaron traslapes en el morfoespacio.

Posiblemente el traslape en la forma de los ecotipos se deban a que el conjunto de poblaciones presentan un sistema del desarrollo similar o sean relativamente similares en términos genéticos (Grbic y Bleeker, 1996; King et al., 2003; Chevalier et al., 2004). Las diferencias entre los ecotipos que no presentan traslapes puede explicarse parcialmente por diferencias genéticas (Chevalier et al., 2004) que responde a temperaturas cálidas. También, las similitudes de las formas pueden explicarse a partir de diferentes condiciones ambientales compartidas como la temperatura y la precipitación ([figura 6 y tabla 3](#)). Sin embargo, para poder visualizar cuál es la causa principal que genera las diferencias o similitudes entre los ecotipos, es necesario ampliar los estudios a un mayor número de ecotipos y de variables ambientales.

## 5.2 Relación entre forma y tamaño de hoja con las variables ambientales

Muchos atributos de las plantas son sensibles a las condiciones ambientales en las que se distribuyen (Woodward, 1987; Walter, 2002), estudios paleo-botánicos han utilizado esta característica para establecer relaciones entre planta-ambiente y reconstruir posibles climas del pasado (Chaloner y Creber, 1990; Demko, 1998). Estos estudios han registrado continuamente correlaciones positivas entre la presencia de lobulaciones o serraciones en las hojas con la MAT del sitio donde provienen los organismos cuando estos se distribuyen a bajas temperaturas (Bailey y Sinnott, 1916; Wolfe, 1979, 1993; Wilf, 1997; Jacobs, 1999, 2002; Gregory- Wodzicki, 2000; Kowalski, 2002; Huff et al., 2003; Greenwood et al., 2004; Greenwood, 2005a; Royer et al., 2005; Traiser et al., 2005).

Contrario a lo esperado, los resultados de la forma descrita a partir de técnicas de morfometría geométrica presentan una baja relación con la MAP y MAT ([figura 9 y tabla 6](#)). Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Krieger y colaboradores (2007) donde ellos tampoco registraron relaciones significativas. Estos autores atribuyen que la falta de

correlación se debe a que no existe una calibración en las bases de datos en estudios donde previamente se utilizaban descriptores como índices de la forma. Finalmente, ellos también señalan que la falta de correlación de la mayoría de estas investigaciones se puede atribuir a que únicamente se ha puesto a prueba en plantas leñosas y no se han utilizado a plantas herbáceas. En este sentido, las especies leñosas tienen un ciclo de vida en el cual están continuamente expuestas a diversas condiciones ambientales, mientras que algunas plantas herbáceas presentan ciclos de vida cortos y el tiempo de exposición al ambiente es más breve.

Es importante señalar que en los resultados obtenidos, los traslapamientos en la forma de la hoja no se pueden explicar por completo a partir de las diferencias en las condiciones climáticas de las que provienen los ecotipos, con excepción del ecotipo Sha que no se ajusta a los traslapamientos compartidos con el resto de los ecotipos con condiciones climáticas similares ([tabla 3](#)).

Una característica importante observada en nuestros resultados es que el componente principal 3 (PC3) está relacionado con la presencia de lóbulos en las hojas de los ecotipos (figura 7A). Particularmente los ecotipos que presentan mayores valores en el PC3 son los que provienen de sitios con temperaturas bajas. Además, bajo el tratamiento de 19°C es más evidente la presencia de lóbulos en estos ecotipos. Estos resultados concuerdan con las observaciones de Royer y colaboradores (2005), así como lo descrito por Krieger y colaboradores (2007) en sus análisis de contornos. Estas relaciones apoyan la relación entre el aumento en el área de la lámina y en el número de lóbulos, que incrementan la tasa fotosintética en temporadas donde la incidencia de luz no es la óptima (Baker-Brosh & Peet, 1997; Royer & Wilf, 2006).

Se ha registrado que la formación de lóbulos permite a las plantas liberar la presión osmótica de la raíz a través de un fenómeno conocido como gutación, evitando de este modo la inundación de espacios intercelulares en las plantas. Este fenómeno es útil en climas fríos donde las embolias por congelación son comunes (Feild et al., 2005). A pesar de que

*Arabidopsis* no presentan estas embolias por congelación, algunos ecotipos de *Arabidopsis* presentan la producción de hidatodos para la liberación de auxina. Este proceso permite controlar la maduración y la diferenciación vascular en el desarrollo de la hoja de *Arabidopsis* (Pilot et al., 2003; Szydlowski et al., 2013; Madsen et al., 2016).

### 5.3 Plasticidad fenotípica de la hoja en los diferentes ecotipos de *Arabidopsis*

El diseño experimental permitió observar los intervalos plásticos desplegados por las ocho poblaciones de *Arabidopsis* bajo diferentes temperaturas. Se observó que la mayor parte de la variación de los organismos se debe a los tratamientos experimentales ([figura 10](#)), también se registraron costos y límites en la plasticidad para el ecotipo de Ove-0. Estos son evidentes al no complementar su ciclo de vida bajo la temperatura más cálida del diseño experimental.

Además, un resultado a remarcar es que el ecotipo Col-0 presentó los valores más bajos de plasticidad en la mayoría los atributos, presentando normas de reacción casi planas. Esto es importante debido a que este ecotipo es utilizado continuamente como organismo modelo en diferentes tipos de investigaciones y particularmente éste ecotipo se ha estado generando en condiciones de laboratorio estándar por varias generaciones. Es probable que los atributos de este ecotipo no se encuentren expuestos a la selección y por esta razón, la variación genética de previos diseños experimentales puede estar acumulándose en respuesta a un nuevo ambiente (Queitsch 2002; Ledón et al., 2010; Rohner et al., 2013), generando así una respuesta canalizada (Debat y David, 2001), es decir, se produce el mismo fenotipo a pesar de la variabilidad ambiental de su entorno. Un modelo realizado por Levis y Pfennig (2016) sugiere que las condiciones constantes de laboratorio pueden llevar a un refinamiento adaptativo a través de la selección, generando cambios genéticos cuantitativos que presentan tanto el incremento o el decremento en la sensibilidad ambiental.

Las normas de reacción de los ocho ecotipos del atributo de la forma presentaron trayectorias similares. En las trayectorias se observa un gradiente claro en la forma de los ecotipos. La zona media de la lámina es el principal eje de cambio incrementando bajo

temperaturas frías y estrechándose en temperaturas cálidas. Es probable que estos cambios direccionales observados en la regulación de la forma de la hoja de *Arabidopsis* ocurran debido a mecanismos fisiológicos, biomecánicos, hidráulicos, entre otros (Givnish y Kriebel, 2017). Estos mecanismos son ciertamente influenciados por el ambiente físico durante su ontogenia (Milthorpe, 1959; Humphries y Wheeler 1963; Whitehead, 1962; Milthorpe y Newton, 1963).

Particularmente, un proceso fisiológico involucrado en el cambio de la forma de la hoja bajo distintas temperaturas, es el de evapotranspiración. Este proceso permite la regulación de la temperatura, el vapor de agua y el dióxido de carbono, los cuales dependen también del tamaño de la hoja (Bonan et al., 1993). Algunas investigaciones han registrado que en bajas temperaturas el balance hídrico es crucial y la demanda por evaporación podría estar asociado al incremento del área foliar, mientras que en condiciones cálidas se presenta una reducción en el tamaño de la lámina para regular la temperatura (Parkhurst et al. 1968; Parkhurst 1968; Vogel 1970). Estas características apoyan lo observado en los resultados de la forma de la hoja de las poblaciones de *Arabidopsis* ([figura 10](#) y [figura 11](#)).

Otros mecanismos posiblemente involucrados en el desarrollo de la forma de la hoja que permiten explicar este gradiente de formas observado bajo el cambio en la temperatura son los asociados al enfriamiento de la temperatura foliar mediante la generación de lóbulos (Givnish 1979; Givnish y Kriebel 2017), el incremento en el patrón de venación de la hoja para dar un mejor soporte y suministro a la hoja y el incremento en el tamaño de la lámina para incrementar la tasa fotosintética (Givnish, 1987; Givnish y Kriebel, 2017). Estos mecanismos permiten mantener las funciones de la hoja bajo diferentes condiciones ambientales (Givnish, 1987). Además, estos cambios se pueden deber a los mecanismos subyacentes que regulan la morfogénesis del atributo (ej. Hormonas, factores de transcripción, elementos cis-regulatorios, etc.) (West-Eberhard, 2003; Moczeck et al, 2011; Williams et al, 2009; Ehrenreich y Pfening, 2015).



## 5.4 Tricomas

Comúnmente los estudios que abordan el cambio en la densidad de tricomas por factores ambientales están relacionados a la herbivoría. Estos estudios reportan que existe una relación positiva entre el aumento en la densidad de tricomas y la presencia de herbívoros (Agrawal, 1999, 2005, 2006, 2007; Dalin, 2003). Además, se ha registrado que existe un incremento en el número de tricomas asociado a altos valores de irradiación (Johnson 1975, Ehleringer and Mooney 1981, Ehleringer 1988, Ehleringer and Cook 1990). Este incremento en el número de tricomas está asociado a una reflexión de la radiación solar, disipando el calor absorbido en la superficie de la hoja, reduciendo la temperatura en la hoja y las tasas de transpiración.

En nuestro diseño experimental no se modificaron las condiciones en la intensidad de luz, ni se presentaron herbívoros dentro de la cámara. Sin embargo, se observó que bajo el tratamiento de 25°C existe un incremento en la densidad de tricomas en la gran mayoría de los ecotipos ([figura 12](#)). Posiblemente esta relación ocurre para reducir la temperatura en la hoja y las tasas de transpiración como lo observado en otros estudios (Burton et al., 1977; Brewer et al., 1991; Steinglein et al, 2005). En contraparte, bajo la temperatura de 19°C es notoria la reducción en la densidad de tricomas en distintos ecotipos. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Gianfagna y colaboradores (1992), donde reportan cambios en la densidad de tricomas a bajas temperaturas en *L. hirsutum* bajo condiciones de día largo y corto.

## 5.5 Índice de disección

Estudios realizados por Amano y colaboradores (2015) registraron que el índice de disección no permite describir diferencias bajo temperaturas de 20°C y 30°C en las hojas de *Rorippa aquatica*, mientras que a bajas temperaturas (15°C) se observan cambios drásticos en el valor del índice. Similarmente, los resultados generados en la presente investigación

concuerdan con lo encontrado por Amano donde en las temperaturas de 22°C y 25°C los ecotipos no presentaron diferencias significativas entre estos tratamientos, mientras que en el tratamiento de 19°C se observan cambios en los valores del índice asociados principalmente a la disección de la hoja ([figura 13](#)). Cabe señalar que *R. aquatica* y *Arabidopsis* pertenecen a la misma familia de Brassicaceae y se ha registrado que existen similitudes en las redes reguladoras del desarrollo de las hojas (Baharathan et al., 2002). Por lo tanto, es probable que las similitudes entre los resultados encontrados en *R. aquatica* y *Arabidopsis* se deban a mecanismos similares subyacentes en la regulación de morfogénesis de la hoja y la interacción entre el ambiente.

## 5.6 Número de hojas

Estudios realizados por Kleiman y Aarssen (2007) señalan que algunas especies de plantas mantienen una relación positiva entre una mayor producción de número de hojas y el tamaño de hojas producidas. Esta observación concuerda con los resultados registrados en la presente investigación, ya que existe un incremento en el número de hojas, el tamaño centroide y el área de las hojas bajo el tratamiento de 19 °C ([figura 14](#)). También, algunas especies leñosas presentan una mayor producción de hojas para hacer frente a daños físicos causados por la nieve o la congelación (Vesk y Westoby, 2004). En efecto, nuestros resultados concuerdan con la relación en el incremento del número de hojas y el tratamiento experimental de 19 °C.

Finalmente, es importante señalar que la evaluación de la plasticidad de los atributos descritos en las secciones de arriba se realizó bajo temperaturas constantes en la cámara de crecimiento, lo cual puede estar subestimando la plasticidad expresable en respuesta a la heterogeneidad espacio-temporal ambiental de los hábitats naturales como lo ha registrado Wayne y Bazzaz (1993). Así mismo, el desarrollarse bajo condiciones constantes de laboratorio, puede estar reduciendo los costos asociados a la plasticidad, pues las señales son fiables y no comprometen el desarrollo de los organismos.

## 5.7 Relación de la plasticidad fenotípica con la heterogeneidad ambiental

Hasta ahora, diferentes modelos teóricos han señalado que la plasticidad fenotípica es favorecida a partir de la heterogeneidad ambiental (Bradshaw y Hardwick, 1989; Alpert y Simms, 2002). Por esa razón, se esperaba que las poblaciones de *Arabidopsis* localizadas en sitios con mayor variación en la estacionalidad de la temperatura (ambientes heterogéneos) presentaran mayores intervalos plásticos en comparación de las poblaciones bajo temperaturas estables y constantes (ambientes homogéneos). Sin embargo, los resultados son opuestos a lo esperado en la hipótesis, con excepción de la plasticidad desplegada en el número de hojas. Es decir, el ecotipo ubicado bajo condiciones de temperatura homogéneas presentó mayores valores de plasticidad en la forma de la hoja en comparación del ubicado en el sitio con mayor estacionalidad de la temperatura ([figura 15 y tabla 8](#)).

En general, los modelos que sugieren una relación positiva entre heterogeneidad ambiental y plasticidad fenotípica que despliegan los organismos, son muy imprecisos en los detalles de escala temporal y ambiental (DeWitt y Scheiner, 2004). Mayoritariamente, estos asumen que las fluctuaciones o son periódicas o estocásticas y no son precisas en las características de la variación (Huey y Kingsolver, 1998). Esto representa un problema que no se ha refinado en estos modelos y que tiene que ser abordado para generar mayor certeza en las predicciones (Levins, 1963). Estas razones pueden ser las causas de concordancia entre las predicciones de los modelos y los resultados obtenidos en la presente investigación a partir de las poblaciones de *Arabidopsis*. Además, los modelos no consideran diversos factores como los ciclos de vida de los organismos (*Arabidopsis* presenta un ciclo de vida corto respecto a los descriptores anuales utilizados para evaluar la hipótesis), tal como lo han identificado Hoverman y Relyea (2008).

Se ha registrado que la temperatura tiene efectos pleiotrópicos en el desarrollo de las plantas (Wang et al., 2003). Diversos estudios han reportado que las poblaciones de plantas difieren en los niveles de plasticidad desplegados por distintos atributos (Linhart y Grant, 1996; Heschel et al., 2002; Maldonado et al., 2003). En este sentido, los resultados

concuerdan con las diferencias presentadas en las respuestas de algunos atributos observados de *Arabidopsis* (positivas, nulas o negativas) y las condiciones de variación de la temperatura ([figura 15](#)). Así mismo, puede ser que la estacionalidad de la temperatura no sea el factor más adecuado para caracterizar la heterogeneidad ambiental o que, los tratamientos de temperatura no sean el mayor factor que desencadene la plasticidad de los atributos registrados.

Moran (1992) propone un modelo donde contrasta explícitamente las diferencias generadas por la heterogeneidad espacial y por la temporal. En su modelo la heterogeneidad de tipo espacial siempre favorecerá la plasticidad fenotípica, siempre y cuando no existan costos relacionados a la plasticidad, así como cambios ambientales impredecibles. En contra parte, la variación temporal, favorece tanto la plasticidad como la canalización debido a los amplios intervalos de condiciones ambientales a los cuales están expuestos los organismos. Estos resultados del modelo concuerdan parcialmente con lo encontrado en los ecotipos de *Arabidopsis*. El presente trabajo propone que algunos atributos son canalizados a mayor variación ambiental de tipo temporal, mientras que mayores intervalos plásticos ocurren en algunos atributos bajo condiciones ambientales temporalmente homogéneas. Atribuimos que la falta de señales ambientales fiables en ambientes heterogéneos da paso a la canalización del fenotipo como estrategia ante la variación ambiental. Por otro lado, en ambientes homogéneos los organismos recurren a la plasticidad fenotípica ante cambios ambientales, siendo estos no necesariamente siempre adaptativos.

## **6. Conclusiones y perspectivas**

El presente trabajo es una una contribución en el conocimiento sobre la relación que tiene la heterogeneidad ambiental con los intervalos de plasticidad fenotípica desplegados en las poblaciones de *Arabidopsis*. Esto se realizó utilizando herramientas de morfometría geométrica, microscopia con luz polarizada, una caracterización ambiental detallada y un diseño experimental dirigido para explorar el cambio causado por cambios en la temperatura. Los resultados permitieron generar las siguientes conclusiones:

- Existe variación en la forma de la hoja entre los ecotipos estudiados en este trabajo, y ésta variación se correlaciona positivamente con la temperatura promedio y la estacionalidad de la temperatura de los sitios donde habitan.
- Las principales diferencias en la forma de la hoja fueron en la parte media de la lámina foliar. Estas diferencias permitieron separar a la mayoría de los ecotipos, y estuvieron asociadas al cambio en la temperatura.
- La mayoría de los ecotipos de *Arabidopsis* utilizados en este trabajo responden plásticamente al cambio en la temperatura. Sin embargo, el tipo de respuesta que exhiben es específica para el atributo.
- Los resultados de las normas de reacción permiten concluir que los cambios en los atributos se deben principalmente al cambio en la temperatura, más que a diferencias intrínsecas de los ecotipos de *Arabidopsis*.
- El ecotipo de Ove-0 no presentó plasticidad fenotípica adaptativa ante un cambio en la temperatura. Esto sugiere que la maquinaria ontogenética de este ecotipo presenta límites o costos para desarrollar respuestas plásticas.
- La baja respuesta de plasticidad en los distintos atributos de Col-0 sugieren, que el uso constante de este ecotipo en condiciones de laboratorio durante varias generaciones, pudieran estar generando una pérdida en la sensibilidad ambiental.
- Una mayor variación en la temperatura del sitio de origen de los ecotipos de *Arabidopsis* no siempre favorece mayores intervalos plásticos. Ésta relación positiva solo se cumple dependiendo del atributo; en algunos atributos es de hecho nula o negativa.

Los resultados obtenidos muestran que la morfometría geométrica es una buena herramienta para estudiar la plasticidad fenotípica en la morfología de las hojas de *Arabidopsis*. Además, permitió describir cuantitativamente las diferencias entre la forma de la hoja de los ecotipos seleccionados y los cambios causados por el cambio en la temperatura. En este sentido, algunas perspectivas que surgen de este trabajo son:

- Estas herramientas pueden ser aplicadas en cualquier otro modelo biológico, como plantas de interés agrícola. Incluso es posible considerar cualquier otra condición ambiental para evaluar la relación organismo-ambiente.
- Aún es necesario evaluar el efecto de la heterogeneidad ambiental considerando diferentes escalas, tanto espaciales como temporales, así como ampliar el número de atributos a evaluar (fisiológicos, genéticos, morfológicos).
- Estudiar la plasticidad fenotípica de la forma de la hoja en un mayor número de poblaciones de *Arabidopsis* o poblaciones emparentadas, bajo diferentes condiciones ambientales.
- Evaluar las diferencias genéticas entre las poblaciones y a través de distintos tratamientos para generar un panorama más comprensivo de los mecanismos subyacentes de la plasticidad fenotípica ligada al cambio de la morfología de la hoja de *Arabidopsis*.

## 7 Literatura citada

- Abràmoff, Michael D., Paulo J. M., & Sunanda J. R. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics international* 11 (7): 36-42.
- Agrawal, A. A. (1998). Induced responses to herbivory and increased plant performance. *Science*, 279 (5354): 1201-1202.
- Agrawal, A. A. (2001). Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science*, 294(5541): 321-326.
- Agrawal, A. A., Laforsch, C., & Tollrian, R. (1999). Transgenerational induction of defences in animals and plants. *Nature*, 401(6748): 60-63.
- Alonso-Blanco, C., Aarts, M. G., Bentsink, L., Keurentjes, J. J., Reymond, M., Vreugdenhil, D., & Koornneef, M. (2009). What has natural variation taught us about plant development, physiology, and adaptation?. *The Plant Cell*, 21(7): 1877-1896.
- Alpert, P., & Simms, E. L. (2002). The relative advantages of plasticity and fixity in different environments: when is it good for a plant to adjust?. *Evolutionary Ecology*, 16(3): 285-297.

- Amano, R., Nakayama, H., Morohoshi, Y., Kawakatsu, Y., Ferjani, A., & Kimura, S. (2015). A decrease in ambient temperature induces post-mitotic enlargement of palisade cells in north american lake cress. *PloS One*, *10*(11): e0141247.
- Angilletta Jr, M. (2009). Looking for answers to questions about heat stress: researchers are getting warmer. *Functional Ecology*, *23*(2): 231-232.
- Auld, J. R., Agrawal, A. A., & Relyea, R. A. (2010). Re-evaluating the costs and limits of adaptive phenotypic plasticity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *277*(1681): 503-511.
- Badyaev, A. (2005). Stress-induced variation in evolution: from behavioural plasticity to genetic assimilation. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *272*(1566): 877-886.
- Badyaev, A., & Foresman, K. (2000). Extreme environmental change and evolution: stress-induced morphological variation is strongly concordant with patterns of evolutionary divergence in shrew mandibles. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *267*(1441): 371-377.
- Baldwin, J. M. (1896). A new factor in evolution. *The American Naturalist*, *30*(354): 441-451.
- Benítez, M., Espinosa-Soto, C., Padilla-Longoria, P., & Alvarez-Buylla, E. R. (2008). Interlinked nonlinear subnetworks underlie the formation of robust cellular patterns in Arabidopsis epidermis: a dynamic spatial model. *BMC Systems Biology*, *2*(1): 98.
- Benítez, M., Monk, N. A., & Alvarez-Buylla, E. R. (2011). Epidermal patterning in Arabidopsis: models make a difference. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *316*(4): 241-253.
- Bharathan, G., Goliber, T. E., Moore, C., Kessler, S., Pham, T., & Sinha, N. R. (2002). Homologies in leaf form inferred from KNOXI gene expression during development. *Science*, *296*(5574): 1858-1860.
- Bharathan, G., Goliber, T. E., Moore, C., Kessler, S., Pham, T., & Sinha, N. R. (2002). Homologies in leaf form inferred from KNOXI gene expression during development. *Science*, *296*(5574): 1858-1860.
- Bonan, G. B., Pollard, D., & Thompson, S. L. (1993). Influence of subgrid-scale heterogeneity in leaf area index, stomatal resistance, and soil moisture on grid-scale land-atmosphere interactions. *Journal of Climate*, *6*(10): 1882-1897.
- Bookstein, F. L. (1996). Combining the tools of geometric morphometrics, *advances in morphometrics*. Springer US, *8*(4): 131-151.
- Bookstein, F. L. (1997). Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape. *Medical Image Analysis*, *1*(3): 225-243.

- Bookstein, F. L. (1997). *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge, Uk. University Press.
- Bradshaw, A. D. (1965). Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in genetics*, 13(7): 115-155.
- Bradshaw, A. D., & Hardwick, K. (1989). Evolution and stress genotypic and phenotypic components. *Biological Journal of the Linnean Society*, 37(1-2): 137-155.
- Breuker, C. J., Debat, V., & Klingenberg, C. P. (2006). Functional evo-devo. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(9): 488-492.
- Brewer, C., Smith, W., & Vogelmann, T. (1991). Functional interaction between leaf trichomes, leaf wettability and the optical properties of water droplets. *Plant, Cell & Environment*, 14(9): 955-962.
- Burton, G., Hanna, W., Johnson, J. C., Leuck, D., Monson, W., Powell, J. & Widstrom, N. (1977). Pleiotropic effects of the tr trichomeless gene in pearl millet on transpiration, forage quality, and pest resistance. *Crop science*, 17(4): 613-616.
- Chaloner, W. G., & Creber, G. T. (1990). Do fossil plants give a climatic signal?. *Journal of the Geological Society*, 147(2): 343-350.
- Charmantier, A., McCleery, R., Cole, L., Perrins, C., Kruuk, L., & Sheldon, C. (2008). Adaptive phenotypic plasticity in response to climate change in a wild bird population. *Science*, 320(5877): 800-803.
- Chevalier, F., Martin, O., Rofidal, V., Devauchelle, A. D., Barteau, S., Sommerer, N., & Rossignol, M. (2004). Proteomic investigation of natural variation between Arabidopsis ecotypes. *Proteomics*, 4(5): 1372-1381.
- Chevin, L. M., Lande, R., & Mace, G. M. (2010). Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: towards a predictive theory. *PLoS Biol*, 8(4), e1000357.
- Chitwood, D., & Sinha, N. (2016). Evolutionary and environmental forces sculpting leaf development. *Current Biology*, 26(7): 297-306.
- Chitwood, D., Headland, L., Filiault, D., Kumar, R., Jiménez-Gómez, J., Schragar, A. & Maloof, J. (2012). Native environment modulates leaf size and response to simulated foliar shade across wild tomato species. *PLoS One*, 7(1): e29570.
- Chitwood, D., Kumar, R., Headland, L., Ranjan, A., Covington, M., Ichihashi, Y., & Sinha, N. (2013). A quantitative genetic basis for leaf morphology in a set of precisely defined tomato introgression lines. *The Plant Cell*, 25(7): 2465-2481.
- Chitwood, D., Ranjan, A., Martinez, C., Headland, L., Thiem, T., Kumar, R., & Downs, N. (2014). A modern ampelography: a genetic basis for leaf shape and venation patterning in grape. *Plant Physiology*, 164(1): 259-272.



- Cookson, S., Chenu, K., & Granier, C. (2007). Day length affects the dynamics of leaf expansion and cellular development in *Arabidopsis thaliana* partially through floral transition timing. *Annals of Botany*, 99(4): 703-711.
- Crispo, E. (2007). The Baldwin effect and genetic assimilation: revisiting two mechanisms of evolutionary change mediated by phenotypic plasticity. *Evolution*, 61(11): 2469-2479.
- Crispo, E. (2008). Modifying effects of phenotypic plasticity on interactions among natural selection, adaptation and gene flow. *Journal of Evolutionary Biology*, 21(6): 1460-1469.
- Dalin, P., & Björkman, C. (2003). Adult beetle grazing induces willow trichome defence against subsequent larval feeding. *Oecologia*, 134(1): 112-118.
- De Jong, M., & Leyser, O. (2012). Developmental plasticity in plants. *Quantitative Biology*, (77): 63-73.
- Debat, V., Alibert, P., David, P., Paradis, E., & Auffray, J. C. (2000). Independence between developmental stability and canalization in the skull of the house mouse. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 267(1442), 423-430.
- Demko, T., Dubiel, R., & Parrish, J. T. (1998). Plant taphonomy in incised valleys: Implications for interpreting paleoclimate from fossil plants. *Geology*, 26(12): 1119-1122.
- Dengler, N., & Tsukaya, H. (2001). Leaf morphogenesis in dicotyledons: current issues. *International Journal of Plant Sciences*, 162(3): 459-464.
- DeWitt, T. J., & Scheiner, S. (2004). *Phenotypic plasticity: functional and conceptual approaches*. Oxford, University Press.
- DeWitt, T. J., Sih, A., & Wilson, D. (1998). Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(2): 77-81.
- Dorn, L., Hammond Pyle, E., & Schmitt, J. (2000). Plasticity to light cues and resources in *Arabidopsis thaliana*: testing for adaptive value and costs. *Evolution*, 54(6): 1982-1994.
- Ehleringer, J. R. (1984). Intraspecific competitive effects on water relations, growth and reproduction in *Encelia farinosa*, *Oecologia*, 63(2): 153-158.
- Ehleringer, J. R., & Clark, C. (1988). Evolution and adaptation in *Encelia* (*Asteraceae*). *Plant Evolutionary Biology* 60(10):221-248.
- Ehleringer, J. R., & Cook, C. S. (1990). Characteristics of *Encelia* species differing in leaf reflectance and transpiration rate under common garden conditions. *Oecologia*, 82(4): 484-489.

- Ehleringer, J., Mooney, H. A., Gulmon, S. L., & Rundel, P. W. (1981). Parallel evolution of leaf pubescence in *Encelia* in coastal deserts of North and South America. *Oecologia*, 49(1): 38-41.
- El-Soda, M., Malosetti, M., Zwaan, B. J., Koornneef, M., & Aarts, M. G. (2014). Genotype × environment interaction QTL mapping in plants: lessons from *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 19(6): 390-398.
- Endler, J. A. (1986). Natural selection and parallel speciation in sympatric sticklebacks. *Science*, 287(5451): 306-308.
- Ernande, B., & Dieckmann, U. (2004). The evolution of phenotypic plasticity in spatially structured environments: implications of intraspecific competition, plasticity costs and environmental characteristics. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(3): 613-628.
- Ernande, B., Dieckmann, U., & Heino, M. (2004). Adaptive changes in harvested populations: plasticity and evolution of age and size at maturation. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 271(1537): 415-423.
- Falconer, D. S. (1985). A note on Fisher's 'average effect' and 'average excess'. *Genetical Research*, 46(03): 337-347.
- Falconer, D. S. (1990). Selection in different environments: effects on environmental sensitivity (reaction norm) and on mean performance. *Genetical Research*, 56(01): 57-70.
- Farmer, Edward, Seyed Mousavi, and Aurore Lenglet. "Leaf numbering for experiments on long distance signalling in *Arabidopsis*." *Protoc. Exch.* doi 10 (2013).
- Fitzpatrick, B. (2012). Underappreciated consequences of phenotypic plasticity for ecological speciation. *International Journal of Ecology*, Article ID 256017: 12.
- Fordyce, J. A. (2006). The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *Journal of Experimental Biology*, 209(12): 2377-2383.
- Fuller, T. (2003). The integrative biology of phenotypic plasticity. *Biology and Philosophy*, 18(2): 381-389.
- Fuller, T., Sarkar, S., & Crews, D. (2005). The use of norms of reaction to analyze genotypic and environmental influences on behavior in mice and rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(3): 445-456.
- Gabriel, W., & Lynch, M. (1992). The selective advantage of reaction norms for environmental tolerance. *Journal of Evolutionary Biology*, 5(1): 41-59.

- Ghalambor, C., McKay, J., Carroll, S., & Reznick, D. (2007). Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology*, 21(3): 394-407.
- Gianoli, E. (2004). Plasticity of traits and correlations in two populations of *Convolvulus arvensis* (Convolvulaceae) differing in environmental heterogeneity. *International Journal of Plant Sciences*, 165(5): 825-832.
- Gianoli, E., & González-Teuber, M. (2005). Environmental heterogeneity and population differentiation in plasticity to drought in *Convolvulus chilensis* (Convolvulaceae). *Evolutionary Ecology*, 19(6): 603-613.
- Givnish, T. (1979). On the adaptive significance of leaf form. En *Topics in plant population biology*. Macmillan Education UK. (375-407).
- Givnish, T. (1987). Comparative studies of leaf form: assessing the relative roles of selective pressures and phylogenetic constraints. *New Phytologist*, 106(1): 131-160.
- Givnish, T., & Kriebel, R. (2017). Causes of ecological gradients in leaf margin entirety: Evaluating the roles of biomechanics, hydraulics, vein geometry, and bud packing. *American Journal of Botany*, 104(3): 354-366.
- Glantz, S. (2002). *Primer of biostatistics*. 4th ed. p.235. McGraw-Hill, New York.
- Gluckman, P., Hanson, M., Bateson, P., Beedle, A., Law, C., Bhutta, Z., & Smith, G. D. (2009). Towards a new developmental synthesis: adaptive developmental plasticity and human disease. *The Lancet*, 373(9675): 1654.
- Gomulkiewicz, R., & Kirkpatrick, M. (1992). Quantitative genetics and the evolution of reaction norms. *Evolution*, 390-411.
- González, A., & Gianoli, E. (2004). Morphological plasticity in response to shading in three *Convolvulus* species of different ecological breadth. *Acta Oecologica*, 26(3): 185-190.
- Grant, P., & Grant, B. (1995). Predicting microevolutionary responses to directional selection on heritable variation. *Evolution*: 241-251.
- Grbic, B., & Bleecker, A. (1996). An altered body plan is conferred on *Arabidopsis* plants carrying dominant alleles of two genes. *Development*, 122(8): 2395-2403.
- Grether, G. (2005). Environmental change, phenotypic plasticity, and genetic compensation. *The American Naturalist*, 166(4): E115-E123.
- Grime, J. P. (1994). The role of plasticity in exploiting environmental heterogeneity. *Exploitation of environmental heterogeneity by plants: Ecophysiological Processes Above-and Belowground*, ed. MM Caldwell, RW Pearcy, 1-19- New York; Academic.

- Gudesblat, G., Schneider-Pizoń, J., Betti, C., Mayerhofer, J., Vanhoutte, I., Van Dongen, W. & Russinova, E. (2012). SPEECHLESS integrates brassinosteroid and stomata signalling pathways. *Nature Cell Biology*, 14(5): 548-554.
- Haughn, G., & Kunst, L. (2010). *Arabidopsis thaliana*: a model organism for molecular genetic studies in plants: How and why was arabidopsis chosen over other plants?. *Biology on the Cutting Edge: Concepts, Issues, and Canadian Research around the Globe (Pearson Canada, Toronto)*: 7-11.
- Heschel, M., Sultan, S., Glover, S., & Sloan, D. (2004). Population differentiation and plastic responses to drought stress in the generalist annual *Polygonum persicaria*. *International Journal of Plant Sciences*, 165(5): 817-824.
- Hijmans, R., & Graham, C. (2006). The ability of climate envelope models to predict the effect of climate change on species distributions. *Global Change Biology*, 12(12): 2272-2281.
- Hoverman, J., & A Relyea, R. (2008). Temporal environmental variation and phenotypic plasticity: a mechanism underlying priority effects. *Oikos*, 117(1): 23-32.
- Huey, R., & Kingsolver, J. (1989). Evolution of thermal sensitivity of ectotherm performance. *Trends in Ecology & Evolution*, 4(5): 131-135.
- Hulskamp, M., Schnittger, A., & Folkers, U. (1998). Pattern formation and cell differentiation: trichomes in Arabidopsis as a genetic model system. *International Review of Cytology*, 186: 147-178.
- Humphries, E., & Wheeler, A. (1963). The physiology of leaf growth. *Annual Review of Plant Physiology*, 14(1): 385-410.
- Humphries, E., & Wheeler, A. (1963). The physiology of leaf growth. *Annual Review of Plant Physiology*, 14(1): 385-410.
- Jablonka, E., & Lamb, M. (2008). Soft inheritance: challenging the modern synthesis. *Genetics and Molecular Biology*, 31(2), 389-395.
- Jablonka, E., & Lamb, M. (2005). Evolution in four dimensions: Genetic, epigenetic, behavioral, and symbolic variation in the history of life. Massachusetts MIT Press.
- Jablonka, E., & Raz, G. (2009). Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *The Quarterly Review of Biology*, 84(2): 131-176.
- Jackson, R. B., & Caldwell, M. M. (1996). Integrating resource heterogeneity and plant plasticity: modelling nitrate and phosphate uptake in a patchy soil environment. *Journal of Ecology*, 891-903.

- Johnson, H. (1975). Plant pubescence: an ecological perspective. *The Botanical Review*, 41(3): 233-258.
- Kaplan, D. (2001). Fundamental concepts of leaf morphology and morphogenesis: a contribution to the interpretation of molecular genetic mutants. *International Journal of Plant Sciences*, 162(3): 465-474.
- Ketola, T., Mikonranta, L., Zhang, J., Saarinen, K., Örmälä, A. M., F., & Laakso, J. (2013). Fluctuating temperature leads to evolution of thermal generalism and preadaptation to novel environments. *Evolution*, 67(10): 2936-2944.
- Kholová, J., Hash, C. T., Kakkerá, A., Kočová, M., & Vadez, V. (2010). Constitutive water-conserving mechanisms are correlated with the terminal drought tolerance of pearl millet. *Journal of Experimental Botany*, 61(2): 369-377.
- Kimura, S., Koenig, D., Kang, J., Yoong, F. Y., & Sinha, N. (2008). Natural variation in leaf morphology results from mutation of a novel KNOX gene. *Current Biology*, 18(9): 672-677.
- King, G., Nienhuis, J., & Hussey, C. (1993). Genetic similarity among ecotypes of *Arabidopsis thaliana* estimated by analysis of restriction fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*, 86(8): 1028-1032.
- Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11(2), 353-357.
- Klingenberg, C., & McIntyre, G. S. (1998). Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution*, 1363-1375.
- Klingenberg, C., & SPENCE, J. (1997). On the role of body size for life-history evolution. *Ecological Entomology*, 22(1): 55-68.
- Klingenberg, C., Duttke, S., Whelan, S., & Kim, M. (2012). Developmental plasticity, morphological variation and evolvability: a multilevel analysis of morphometric integration in the shape of compound leaves. *Journal of Evolutionary Biology*, 25(1): 115-129.
- Koenig, D., & Sinha, N. (2007). Genetic control of leaf shape. *Encyclopedia of Life Sciences*. Accedido en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0020101/pdf>
- Lande, R. (2009). Adaptation to an extraordinary environment by evolution of phenotypic plasticity and genetic assimilation. *Journal of evolutionary biology*, 22(7): 1435-1446.
- Ledón-Rettig, C., Pfennig, D., & Crespi, E. (2010). Diet and hormonal manipulation reveal cryptic genetic variation: implications for the evolution of novel feeding

strategies. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 277(1700): 3569-3578.

- Levins, R. (1963). Theory of fitness in a heterogeneous environment. II. Developmental flexibility and niche selection. *The American Naturalist*, 97(893): 75-90.
- Levins, R. (1968). *Evolution in changing environments: some theoretical explorations*. Princeton University Press. 12-233.
- Levis, N., & Pfennig, D. (2016). Evaluating 'plasticity-first' evolution in nature: key criteria and empirical approaches. *Trends in Ecology & Evolution*, 31(7): 563-574.
- Linhart, Y., & Grant, M. (1996). Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27(1): 237-277.
- List, S. (1994). The Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre. *Nottingham: The University of Nottingham*, 147.
- Maldonado, C., Squeo, F. A., & Ibacache, E. (2003). Phenotypic response of *Lycopersicon chilense* to water deficit. *Revista chilena de historia natural*, 76(1), 129-137.
- Matesanz, S., Gianoli, E., & Valladares, F. (2010). Global change and the evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1206(1): 35-55.
- McLellan, T. (2005). Correlated evolution of leaf shape and trichomes in *Begonia dregei* (Begoniaceae). *American Journal of Botany*, 92(10): 1616-1623.
- McLellan, T., & Endler, J. (1998). The relative success of some methods for measuring and describing the shape of complex objects. *Systematic Biology*, 47(2): 264-281.
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., & Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389): 662-682.
- Merilä, Juha, and Andrew P. Hendry. "Climate change, adaptation, and phenotypic plasticity: the problem and the evidence." *Evolutionary Applications* 7.1 (2014): 1-14.
- Milne, B. T. (1991). Heterogeneity as a multiscale characteristic of landscapes. *Ecological heterogeneity*, (67): 69-84.
- Milthorpe, F. L. (1961). The nature and analysis of competition between plants of different species. In *Mechanisms in biological competition. Symposium Social Exerimental Biology* (15): 330-355.

- Milthorpe, F. L., & Newton, P. (1963). Studies n the expansion of the leaf surface: III. The influence of radiation on cell division and leaf expansion. *Journal of Experimental Botany*, 14(3): 483-495.
- Miner, B. G., Sultan, S. E., Morgan, S. G., Padilla, D. K., & Relyea, R. A. (2005). Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(12): 685-692.
- Mitteroecker, P., & Gunz, P. (2009). Advances in geometric morphometrics. *Evolutionary Biology*, 36(2): 235-247.
- Monteiro, L. R. (1999). Multivariate regression models and geometric morphometrics: the search for causal factors in the analysis of shape. *Systematic Biology*, 48(1): 192-199.
- Moran, N. A. (1992). The evolutionary maintenance of alternative phenotypes. *The American Naturalist*, 139(5): 971-989.
- Moran, N. A. (1992). The evolutionary maintenance of alternative phenotypes. *The American Naturalist*, 139(5): 971-989.
- Morohashi, K., & Grotewold, E. (2009). A systems approach reveals regulatory circuitry for Arabidopsis trichome initiation by the GL3 and GL1 selectors. *PLoS Genet*, 5(2): e1000396.
- Müller, G. (2007). Evo–devo: extending the evolutionary synthesis. *Nature Reviews Genetics*, 8(12): 943-949.
- Müller, M., & Schmidt, W. (2004). Environmentally induced plasticity of root hair development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 134(1): 409-419.
- Myster, J., & Moe, R. (1995). Effect of diurnal temperature alternations on plant morphology in some greenhouse crops a mini review. *Scientia Horticulturae*, 62(4): 205-215.
- Nakayama, H., Nakayama, N., Seiki, S., Kojima, M., Sakakibara, H., Sinha, N., & Kimura, S. (2014). Regulation of the KNOX-GA gene module induces heterophyllic alteration in North American lake cress. *The Plant Cell*, 26(12): 4733-4748.
- Nicotra, A. B., Atkin, O. K., Bonser, S. P., Davidson, A. M., Finnegan, E. J., Mathesius, U. Van Kleunen, M. (2010). Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in plant science*, 15(12): 684-692.
- Nicotra, A., Leigh, A., Boyce, C., Jones, C., Niklas, K., Royer, D., & Tsukaya, H. (2011). The evolution and functional significance of leaf shape in the angiosperms. *Functional Plant Biology*, 38(7): 535-552.
- Nicotra, Adrienne B., et al. "Plant phenotypic plasticity in a changing climate." *Trends in Plant Science* 15.12 (2010): 684-692.

- Niklas, K. J. (1994). *Plant allometry: the scaling of form and process*. University of Chicago Press.
- Nylin, S., & Gotthard, K. (1998). Plasticity in life-history traits. *Annual Review of Entomology*, 43(1): 63-83.
- Palmer, C. M., Bush, S. M., & Maloof, J. N. (2012). Phenotypic and developmental plasticity in plants. *Encyclopedia of life Sciences*. Wiley & Sons, Ltd. Chichester, UK.
- Pérez-Estrada, L. B., Cano-Santana, Z., & Oyama, K. (2000). Variation in leaf trichomes of *Wigandia urens*: environmental factors and physiological consequences. *Tree Physiology*, 20(9): 629-632.
- Pickett, S. T., & Rogers, K. H. (1997). Patch dynamics: the transformation of landscape structure and function. In *Wildlife and landscape ecology* (pp. 101-127). Springer New York.
- Picó, F. X., Méndez-Vigo, B., Martínez-Zapater, J. M., & Alonso-Blanco, C. (2008). Natural genetic variation of *Arabidopsis thaliana* is geographically structured in the Iberian peninsula. *Genetics*, 180(2): 1009-1021.
- Pigliucci, M. (2004). *Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes*. Oxford University Press on Demand: 440.
- Pigliucci, M. (2004). *Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes*. Oxford University Press on Demand. (49-227).
- Pigliucci, M. (2005). Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology & Evolution*, 20(9): 481-486.
- Pigliucci, M., & Murren, C. (2003). Perspective: Genetic assimilation and a possible evolutionary paradox: can macroevolution sometimes be so fast as to pass us by?. *Evolution*, 57(7): 1455-1464.
- Pigliucci, M., Murren, C., & Schlichting, C. (2006). Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *Journal of Experimental Biology*, 209(12): 2362-2367.
- Pigliucci, M., Whitton, J., & Schlichting, C. (1995). Reaction norms of *Arabidopsis*. I. Plasticity of characters and correlations across water, nutrient and light gradients. *Journal of Evolutionary Biology*, 8(4): 421-438.
- Poethig, R. S. (1997). Leaf morphogenesis in flowering plants. *The Plant Cell*, 9(7): 1077.
- Pomeranz, M., Campbell, J., Siegal-Gaskins, D., Engelmeier, J., Wilson, T., Fernandez, V., & Grotewold, E. (2013). High-resolution computational imaging of leaf hair patterning using polarized light microscopy. *The Plant Journal*, 73(4): 701-708.



- Price, T. D., Qvarnström, A., & Irwin, D. (2003). The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1523): 1433-1440.
- Queitsch, C., Sangster, T., & Lindquist, S. (2002). Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature*, 417(6889): 618-624.
- Rees, M., Grubb, P., & Kelly, D. (1996). Quantifying the impact of competition and spatial heterogeneity on the structure and dynamics of a four-species guild of winter annuals. *The American Naturalist*, 147(1): 1-32.
- Reusch, T. B., & Wood, T. E. (2007). Molecular ecology of global change. *Molecular Ecology*, 16(19): 3973-3992.
- Reynaud, S., Leclercq, N., Romaine-Lioud, S., Ferrier-Pagés, C., Jaubert, J., & Gattuso, J. P. (2003). Interacting effects of CO<sub>2</sub> partial pressure and temperature on photosynthesis and calcification in a scleractinian coral. *Global Change Biology*, 9(11): 1660-1668.
- Richards, C. L., Bossdorf, O., Muth, N. Z., Gurevitch, J., & Pigliucci, M. (2006). Jack of all trades, master of some? On the role of phenotypic plasticity in plant invasions. *Ecology Letters*, 9(8): 981-993.
- Robinson, B. W., & Dukas, R. (1999). The influence of phenotypic modifications on evolution: the Baldwin effect and modern perspectives. *Oikos*, 582-589.
- Robinson, D., & Rorison, I. H. (1988). Plasticity in grass species in relation to nitrogen supply. *Functional Ecology*, 249-257.
- Rohlf, F. (1990). Morphometrics. *Annual Review of ecology and Systematics*, 21(1): 299-316.
- Rohlf, F. (1998). On applications of geometric morphometrics to studies of ontogeny and phylogeny. *Systematic Biology*, 47(1): 147-158.
- Rohlf, F., & Marcus, L. (1993). A revolution morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(4): 129-132.
- Rohner, N., Jarosz, D. F., Kowalko, J., Yoshizawa, M., Jeffery, W., Borowsky, R., & Tabin, C. (2013). Cryptic variation in morphological evolution: HSP90 as a capacitor for loss of eyes in cavefish. *Science*, 342(6164): 1372-1375.
- Ross, A. (2004). Procrustes analysis. *Course report, Department of Computer Science and Engineering, University of South Carolina*. 29(1): 2004
- Rutherford, S. (2000). From genotype to phenotype: buffering mechanisms and the storage of genetic information. *Bioessays*, 22(12): 1095-1105.

- Ryser, P., & Eek, L. (2000). Consequences of phenotypic plasticity vs. interspecific differences in leaf and root traits for acquisition of aboveground and belowground resources. *American Journal of Botany*, 87(3): 402-411.
- Sarkar, S. (2004). From the Reaktionsnorm to the evolution of adaptive plasticity. *Phenotypic plasticity. Functional and conceptual approaches*. (DeWitt, T., Scheiner, S., eds):191-200, *Oxford University Press*.
- Scheiner, S. M. (1993). Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24(1): 35-68.
- Scheiner, S. M. (1993). Plasticity as a selectable trait: reply to Via. *The American Naturalist*, 142(2): 371-373.
- Schlichting, C. D. (1986). The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 17(1): 667-693.
- Schlichting, C. (2004). The role of phenotypic plasticity in diversification. *Phenotypic Plasticity: functional and conceptual approaches*, (DeWitt, T., Scheiner, S., eds): 191-200. *Oxford University Press*.
- Schlichting, C. D., & Pigliucci, M. (1995). Gene regulation, quantitative genetics and the evolution of reaction norms. *Evolutionary Ecology*, 9(2): 154-168.
- Schneider, C., Wayne S. and Kevin W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7): 671.
- Schwander, T., & Leimar, O. (2011). Genes as leaders and followers in evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 26(3): 143-151.
- Sheets, H., Covino, K., Panasiewicz, J., & Morris, S. (2006). Comparison of geometric morphometric outline methods in the discrimination of age-related differences in feather shape. *Frontiers in Zoology*, 3(1): 15.
- Sicard, A., Thamm, A., Marona, C., Lee, Y., Wahl, V., Stinchcombe, J., & Lenhard, M. (2014). Repeated evolutionary changes of leaf morphology caused by mutations to a homeobox gene. *Current Biology*, 24(16): 1880-1886.
- Silva, M., De Andrade, I., & Mayo, S. (2012). Geometric morphometrics of leaf blade shape in *Montrichardia linifera* (Araceae) populations from the Rio Parnaíba Delta, north-east Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 170(4): 554-572.
- Simpson, G. (1953). The baldwin effect. *Evolution*, 7(2): 110-117.
- Somero, G. (2004). Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic "strategies". *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 139(3): 321-333.
- Sparrow, A. (1999). A heterogeneity of heterogeneities. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(11): 422-423.

- Stearns, S., & Koella, J. (1986). The evolution of phenotypic plasticity in life-history traits: predictions of reaction norms for age and size at maturity. *Evolution*: 893-913.
- Steiner, U., & Van Buskirk, J. (2008). Environmental stress and the costs of whole-organism phenotypic plasticity in tadpoles. *Journal of Evolutionary Biology*, 21(1): 97-103.
- Stenglein, S., Arambarri, A., Sevillano, M., & Balatti, P. (2005). Leaf epidermal characters related with plant's passive resistance to pathogens vary among accessions of wild beans *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* (Leguminosae–Phaseoleae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 200(3): 285-295.
- Stewart, A., John, E., & Hutchings, M. (2000). The world is heterogeneous: ecological consequences of living in a patchy environment. *The ecological consequences of environmental heterogeneity, The 40th Symposium of the British Ecological Society* (eds Hutchings M., John E., Stewart A.):9-32. Blackwell Science, Oxford.
- Steyn, W., Wand, S., Holcroft, D., & Jacobs, G. (2002). Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*, 155(3): 349-361.
- Strauss, S., & Agrawal, A. (1999). The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(5): 179-185.
- Sultan, S. (1995). Phenotypic plasticity and plant adaptation. *Acta botanica neerlandica*, 44(4): 363-383.
- Sultan, S. (2000). Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in plant science*, 5(12): 537-542.
- Sultan, S. (2003). Phenotypic plasticity in plants: a case study in ecological development. *Evolution & Development*, 5(1): 25-33.
- Sultan, S. E. (1987). Evolutionary implications of phenotypic plasticity in plants. In *Evolutionary biology* Springer, US. 127-178.
- Sultan, S., & Spencer, H. (2002). Metapopulation structure favors plasticity over local adaptation. *The American Naturalist*, 160(2): 271-283.
- Suzuki, Y., & Nijhout, H. (2006). Evolution of a polyphenism by genetic accommodation. *Science*, 311(5761): 650-652.
- Suzuki, Y., & Nijhout, H. (2008). Constraint and developmental dissociation of phenotypic integration in a genetically accommodated trait. *Evolution & development*, 10(6): 690-699.
- Szymanski, D., & Marks, M. (1998). GLABROUS1 overexpression and TRIPTYCHON alter the cell cycle and trichome cell fate in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 10(12): 2047-2062.

- Tallis, M. J., Lin, Y., Rogers, A., Zhang, J., Street, N. R., Miglietta, F., & Taylor, G. (2010). The transcriptome of *Populus* in elevated CO<sub>2</sub> reveals increased anthocyanin biosynthesis during delayed autumnal senescence. *New Phytologist*, *186*(2): 415-428.
- Tattini, M., Gravano, E., Pinelli, P., Mulinacci, N., & Romani, A. (2000). Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *New Phytologist*, *148*(1): 69-77.
- Terradas, J., Penuelas, J., & Lloret, F. (2009). The fluctuation niche in plants. *International Journal of Ecology*, 959702, doi:10.1155/2009/959702.
- Thompson, J. D. (1991). Phenotypic plasticity as a component of evolutionary change. *Trends in Ecology & Evolution*, *6*(8): 246-249.
- Tsukaya, H. (2003). Organ shape and size: a lesson from studies of leaf morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology*, *6*(1): 57-62.
- Turesson, G. (1925). The plant species in relation to habitat and climate. *Hereditas*, *6*(2): 147-236.
- Uchida, N., Kimura, S., Koenig, D., & Sinha, N. (2010). Coordination of leaf development via regulation of KNOX1 genes. *Journal of plant research*, *123*(1): 7.
- Valladares, F., Gianoli, E., & Gómez, J. M. (2007). Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytologist*, *176*(4): 749-763.
- Valladares, F., Matesanz, S., Guilhaumon, F., Araújo, M., Balaguer, L., Benito-Garzón, M., & Nicotra, A. (2014). The effects of phenotypic plasticity and local adaptation on forecasts of species range shifts under climate change. *Ecology Letters*, *17*(11): 1351-1364.
- Van Buskirk, J., & Steiner, U. K. (2009). The fitness costs of developmental canalization and plasticity. *Journal of Evolutionary Biology*, *22*(4): 852-860.
- Van Kleunen, M., & Fischer, M. (2005). Constraints on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants. *New Phytologist*, *166*(1): 49-60.
- Van Tienderen, P. H. (1997). Generalists, specialists, and the evolution of phenotypic plasticity in sympatric populations of distinct species. *Evolution*, *65*(2): 1372-1380.
- Veski, P. A., & Westoby, M. (2004). Funding the bud bank: a review of the costs of buds. *Oikos*, *106*(1): 200-208.
- Via, S. (1987). Genetic constraints on the evolution of phenotypic plasticity. In *Genetic constraints on adaptive evolution*, ed. V. Loeschcke, Springer Verlag, Berlin Heidelberg. (47-71).
- Via, S. (1993). Adaptive phenotypic plasticity: target or by-product of selection in a variable environment?. *The American Naturalist*, *142*(2): 352-365.

- Via, S., & Lande, R. (1985). Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution*, 15(2): 505-522.
- Via, S., & Lande, R. (1987). Evolution of genetic variability in a spatially heterogeneous environment: effects of genotype-environment interaction. *Genetical Reasearch*, 49(02): 147-156.
- Via, S., Gomulkiewicz, R., De Jong, G., Scheiner, S. M., Schlichting, C., & Van Tienderen, P. (1995). Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. *Trends in Ecology & Evolution*, 10(5): 212-217.
- Viscosi, V. (2015). Geometric morphometrics and leaf phenotypic plasticity: assessing fluctuating asymmetry and allometry in European white oaks (*Quercus*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 179(2): 335-348.
- Viscosi, V., & Cardini, A. (2011). Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: a simplified protocol for beginners. *PLoS One*, 6(10): e25630.
- Waddington, C. (1942). Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*, 150(3811): 563-565.
- Waddington, C. (1953). Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution*, 8(2): 118-126.
- Waddington, C. H. (2014). The strategy of the genes, *Evolution*, 1(20): 510-515.
- Walter, H., & Breckle, S. (2002). *Walter's Vegetation of the Earth*. Springer Verlag INC, NewYork. 7-23.
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1): 1-14.
- Wayne, P. M., & Bazzaz, F. A. (1993). Morning vs afternoon sun patches in experimental forest gaps: consequences of temporal incongruency of resources to birch regeneration. *Oecologia*, 94(2): 235-243.
- Weiner, J. (2004). Allocation, plasticity and allometry in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 6(4): 207-215.
- Weinig, C., & Delph, L. (2001). Phenotypic plasticity early in life constrains developmental responses later. *Evolution*, 55(5): 930-936.
- Went, F. (1953). The effect of temperature on plant growth. *Annual Review of Plant Physiology*, 4(1): 347-362.
- West-Eberhard, M. (1989). Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annual review of Ecology and Systematics*, 20(1): 249-278.

- West-Eberhard, M. (2005). Developmental plasticity and the origin of species differences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(1): 6543-6549.
- West-Eberhard, M. (2003). *Developmental plasticity and evolution*. Oxford University Press, New York, ed. 1: 34-793.
- Whitehead, F. (1962). Experimental studies of the effect of wind on plant growth and anatomy. *New Phytologist*, 61(1): 59-62.
- Whitman, D., & Agrawal, A., (2009). What is phenotypic plasticity and why is it important? In *Phenotypic Plasticity of Insects* (Whitman, D.W. and Ananthakrishnan, T.N., eds): 1-63, Science Publishers.
- Wiens, J. (1989). Spatial scaling in ecology. *Functional ecology*, 3(4): 385-397.
- Wiens, J. A. (2000). Ecological heterogeneity: an ontogeny of concepts and approaches. In *The ecological consequences of environmental heterogeneity*, (Eds Hutchings, M., John, E., & Stewart, A.,). *Blackwell Science*, Oxford, 9-31.
- Wilf, P., Wing, S., Greenwood, D. R., & Greenwood, C. L. (1998). Using fossil leaves as paleoprecipitation indicators: an Eocene example. *Geology*, 26(3): 203-206.
- Williams, G. (1966). Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle. *The American Naturalist*, 100(916): 687-690.
- Woodward, F. (1987). *Climate and plant distribution*. Cambridge, UK. University Press: 86-200.
- Xu, F., Guo, W., Xu, W., Wei, Y., & Wang, R. (2009). Leaf morphology correlates with water and light availability: What consequences for simple and compound leaves?. *Progress in Natural Science*, 19(12): 1789-1798.
- Zelditch, M. L., Swiderski, D., & Sheets, D. (2012). *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. NY, USA. Academic Press *El Servier*.
- Zhang, J., & Lechowicz, M. (1994). Correlation between time of flowering and phenotypic plasticity in *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*). *American Journal of Botany*, 15 (24): 1336-1342.
- Zhivotovsky, L. A., Feldman, M. W., & Bergman, A. (1996). On the evolution of phenotypic plasticity in a spatially heterogeneous environment. *Evolution*, 547-558.

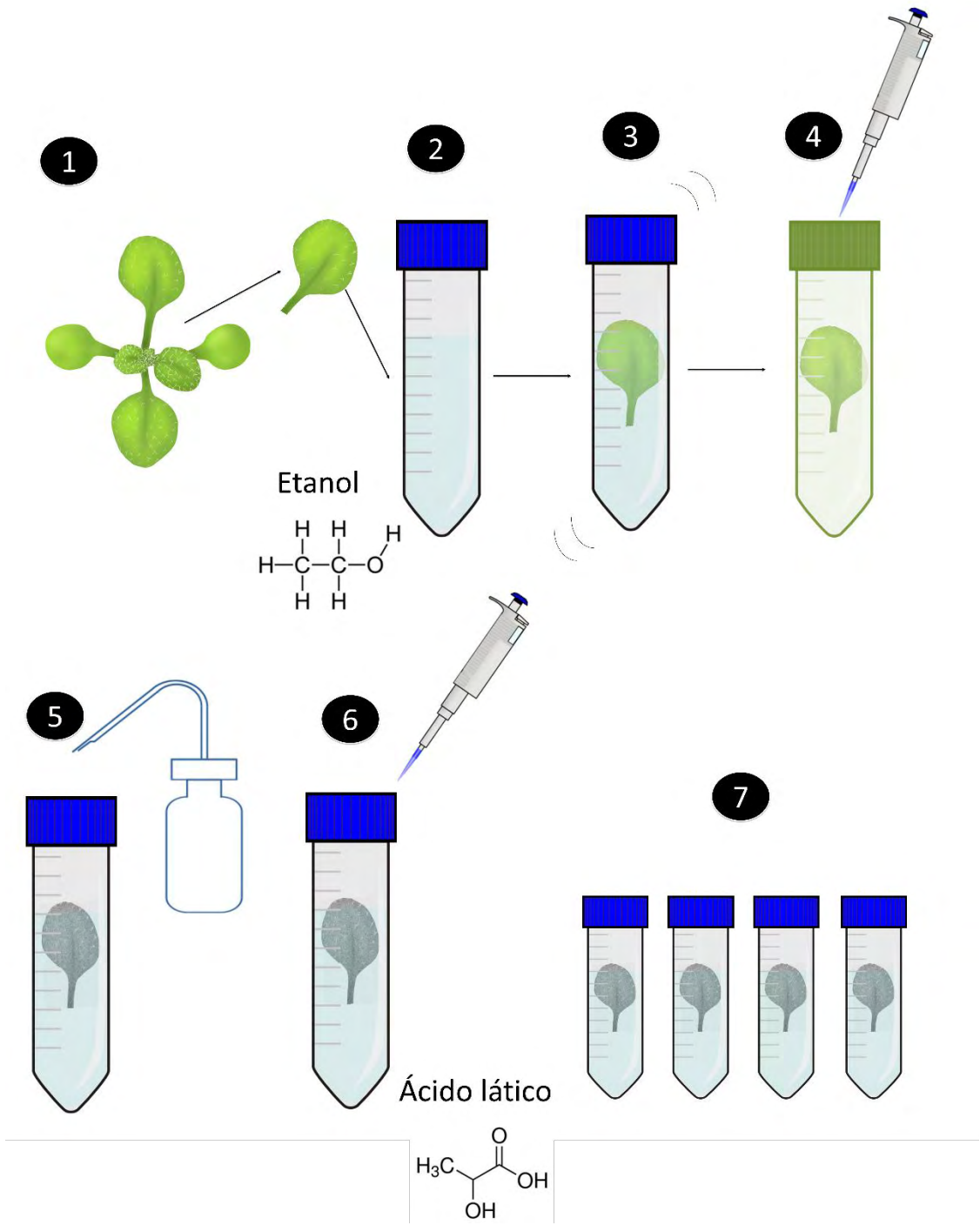
## 8 Anexos

\*\*\*\*\*

### Anexo 1. Protocolos.

#### Anexo 1.1 *Protocolo para el aclaramiento de hojas.*

1. Seleccionar la hoja que se desea aclarar (en la presente investigación se utilizó la hoja número seis). En seguida hay que colocarla en cajas Petri o en tubos Falcon de 15mL.
2. Adicionar etanol al 70% cubriendo toda la hoja (es importante que el alcohol cubra toda el área de la hoja para que el aclaramiento sea homogéneo).
3. Agitar uniformemente el frasco que contenga el etanol y las hojas, esto puede realizarse por medio de un agitador o mezclador del laboratorio.
4. Las hojas pueden mantenerse en agitación durante dos días, sin embargo, es necesario que el contenido de etanol sea retirado del envase. El tamaño de la hoja es importante debido a que existe una relación de a mayor tamaño, mayor tiempo de exposición al etanol.
5. Una vez que las hojas se notan aclaradas y no se desprenden más residuos fotosintéticos, se retira el etanol del envase y se pueden hacer baños con agua directa.
6. Inmediatamente, se coloca ácido láctico al 70% y se calienta el envase durante 15 minutos.
7. Finalizado este proceso, las muestras pueden almacenarse a temperatura ambiente durante meses o pueden ser utilizadas en el momento.



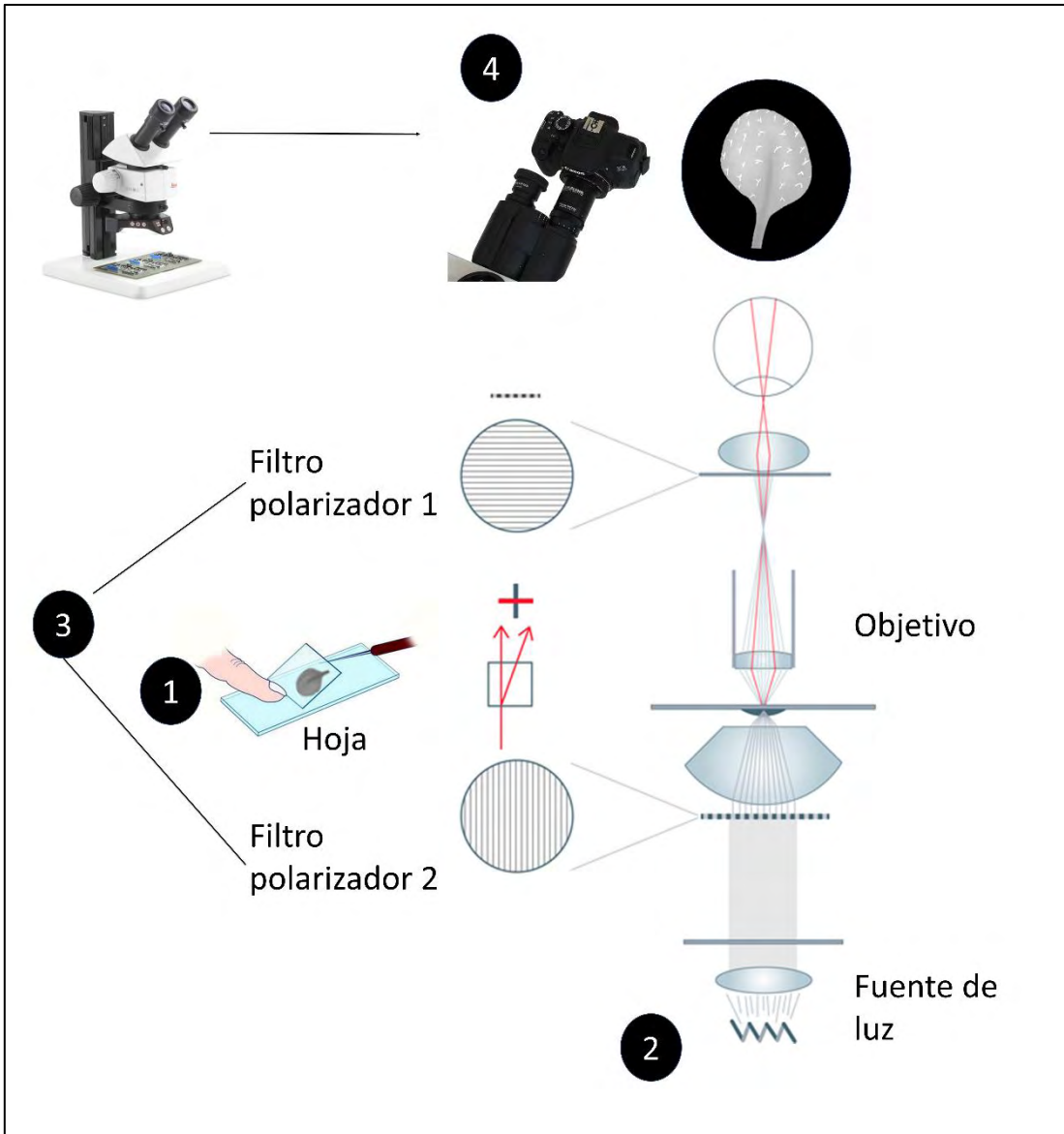
\*Es altamente recomendable hacer un uso adecuado del equipo de laboratorio y usar bata, el uso de pinzas es muy importante para manipular las hojas con el ácido láctico.



**Anexo 1.2 Protocolo para la toma de imágenes polarizadas en microscopio estereoscópico.**

1. Montar la hoja en un porta objetos y agregar unas gotas de ácido láctico sobre esta. Inmediatamente, colocar un cubre objetos sobre las hojas, es importante que al colocarlo, no se generen burbujas, ya que estas impiden un conteo adecuado de los tricomas.
2. Colocar una fuente de luz en la parte inferior del organismo a fotografiar (\*puede ser una Tablet, preferentemente con un fondo azul o blanco bien iluminado).
3. Colocar un filtro por encima de la fuente de luz, así mismo, colocar otro filtro sobre el objetivo a fotografiar. Es importante que en este paso se ajusten los filtros hasta alcanzar la fase oscura que se genera mediante el uso de los filtros. En este paso, los tricomas presentan un brillo contrastante con el fondo negro generado por los filtros polarizados.
4. Es importante que la cámara con la que se tomó la foto mantenga condiciones continuas del diafragma  $f$  de 5.6, EV -1 y que la toma de imágenes se realice bajo condiciones de poca luz. Realizar esta estandarización del método ofrece una mejora en la calidad de las imágenes.

Este protocolo puede modificarse, dependiendo el tipo de microscopio, sin embargo, el principio de la microscopia de luz polarizada debe de realizarse de esta manera para la obtención de imágenes de alto contraste.



Anexo 2. Tabla de las 19 variables bioclimáticas de los sitios donde provienen los ecotipos de *Arabidopsis*.

Ecotipo	latitud	longitud	Temperatura media anual (MAT)	Intervalo promedio diario	Isotermalidad	Estacionalidad de la temperatura (%)	Temperatura máxima del mes más cálido
<b>Columbia (Col-0)</b>	38.5	-92.5	12.8	12.4	31	93.21	32.0
<b>Cape Verdi (Cvi-0)</b>	15.1111	-23.6	22.2	7	62	14.56	27.6
<b>Tabor (Ta-0)</b>	49.5	14.5	7.1	8.9	32	69.02	22.2
<b>San Eleno (Se-0)</b>	38.3333	-3.5	15	12	37	68.59	34.1
<b>Altai (altai-5)</b>	47.75	88.4	3.6	12.7	25	136.3	27.5
<b>Kyoto (Kyo)</b>	35.0085	135.7	15.5	9	28	81.75	32.5
<b>Ovelgoenne (Ove-0)</b>	53.3422	8.4	8.8	7.5	32	58	21.3
<b>Shahdara (Sha)</b>	38.3	68.4	12.1	12.7	34	82.29	32.1

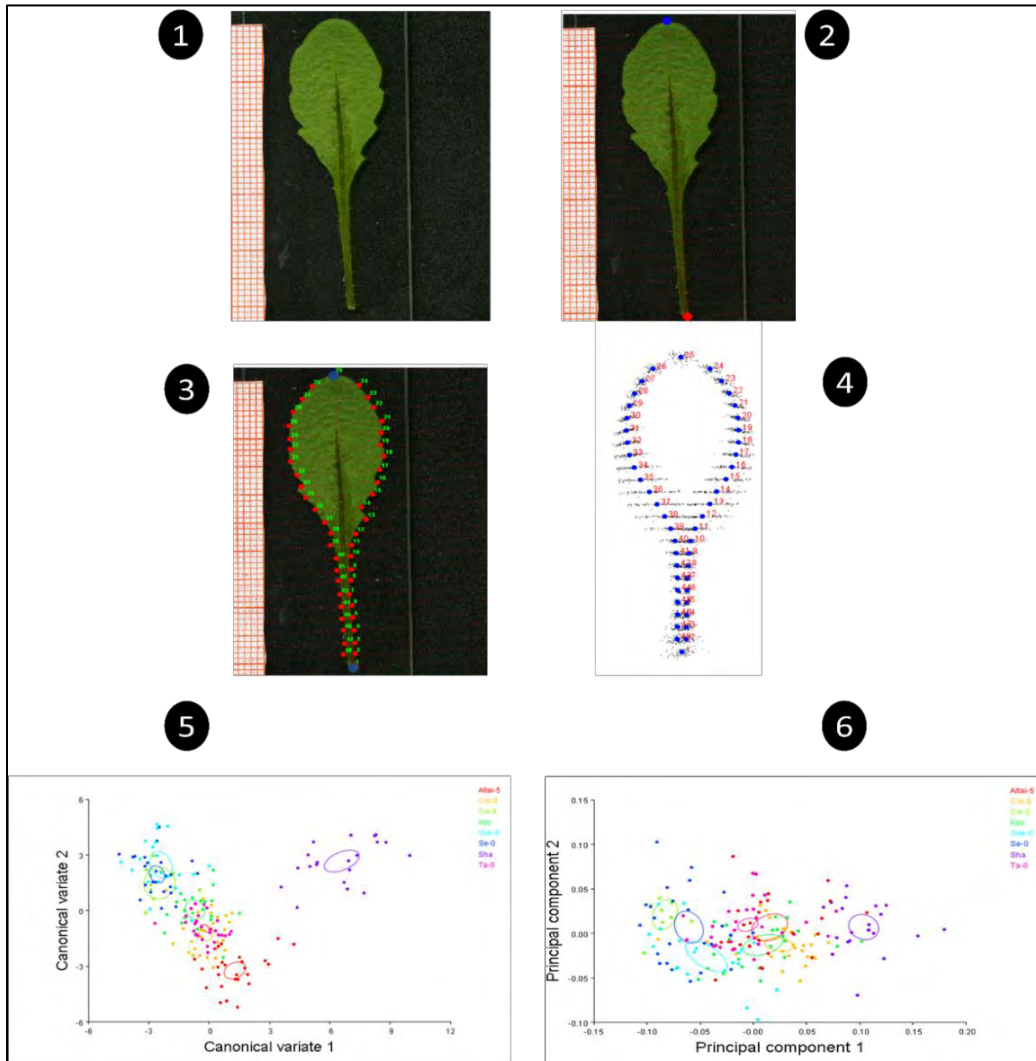
Ecotipo	Temperatura mínima del mes más frío °C	Intervalo anual de la temperatura °C	Temperatura promedio del cuarto más húmedo °C	Temperatura promedio del cuarto más seco °C	Temperatura promedio del cuarto más cálido	Temperatura promedio del cuarto más frío °C	Precipitación promedio anual
Columbia (Col-0)	-7.2	39.2	18.0	2	24.4	2	1005
Cape Verdi (Cvi-0)	16.4	11.2	24.1	213	24.1	20.4	369
Tabor (Ta-0)	-5.6	27.8	15.9	-7	15.9	-1.8	688
San Eleno (Se-0)	1.7	32.4	10.2	242	24.2	6.8	502
Altai (altai-5)	-2.29	5.04	19.7	-124	19.7	-15.2	169
Kyoto (Kyo)	4	32.1	25.7	53	26.1	5.3	1727
Ovelgoenne (Ove-0)	-1.6	22.9	16.1	41	16.1	1.4	761
Shahdara (Sha)	-4.7	36.8	6.9	214	22.7	1.3	580

Ecotipo	Precipitación del mes más húmedo	Precipitación del mes más seco	Estacionalidad de la precipitación	Precipitación del cuarto más húmedo.	Precipitación del cuarto más seco.	Precipitación del cuarto más cálido.	Precipitación del cuarto más frío.
Columbia (Col-0)	128	36	30	334	142	287	142
Cape Verdi (Cvi-0)	149	0	150	315	0	315	5
Tabor (Ta-0)	92	35	36	264	117	264	118

San Eleno (Se-0)	69	6	48	184	34	34	164
Altai (altai-5)	26	7	33	61	24	61	31
Kyoto (Kyo)	244	66	42	665	222	635	222
Ovelgoenn e (Ove-0)	81	39	18	233	141	233	168
Shahdara (Sha)	117	0	79	293	6	10	204

### Anexo 3.- Protocolo de morfometría geométrica empleado para la presente investigación.

Serie de pasos para el análisis de morfometría geométrica.



1.- Imagen obtenida a partir del escáner Epson Perfection.

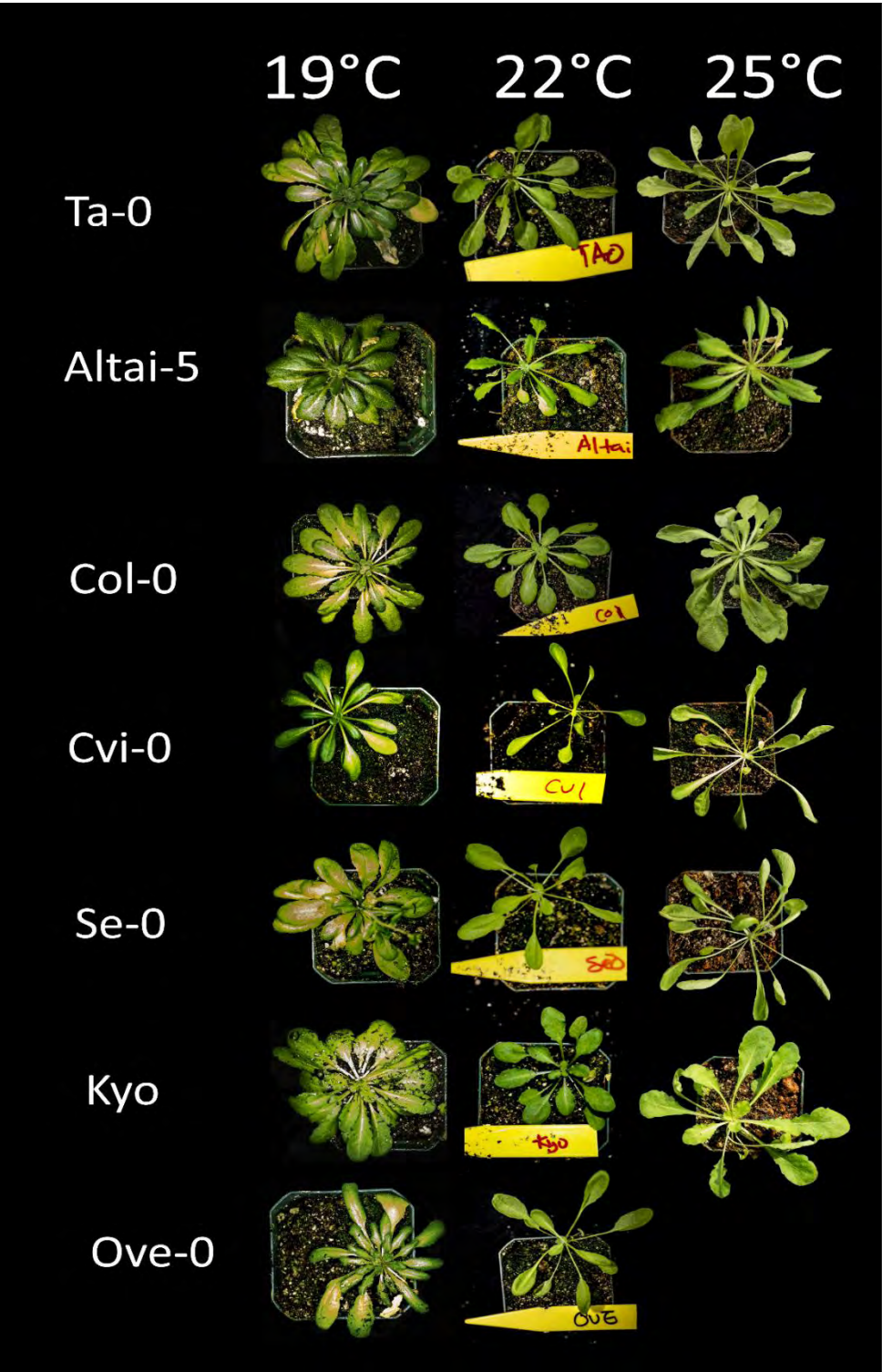
2.- Peine generado con el programa MakeFan6g.

3.-Marcas generadas con el programa TpsDig y Semi marcas señaladas con el programa SemiLand. Las marcas se encuentran de color azul, mientras que las semi marcas se encuentran de color rojo.

4.-Metodo de superposición de Procrustes realizado en el MorphoJ. 5.-Análisis de Variables canónicas empleando Morphoj.

6.-Análisis de Componentes Principales empleando el Morphoj

Anexo 4 .- Imágenes de los ecotipos bajo los tres tratamientos, vista superior.



## Anexo 5.- Material Electrónico Suplementario.

Anexo

Código para correr en Rstudio 3.3.1

```
#ANOVA (atributos) #
```

```
#Base de datos de tricomas, número de hojas, área #
```

```
Attach ()
```

```
Tricomas totales (nombre del archivo)
```

```
Número de tricomas
```

```
Tratamiento (es la temperatura)
```

```
Ecotipos
```

```
>boxplot(tratamiento$Número de tricomas~tricomas totales$ecotipo*tricomas  
totales$tratamiento)
```

```
>plot.design(tricomas totales,main="Main effects")
```

```
>interaction.plot(tricomas totales$tratamiento, tricomas totales$ecotipo, tricomas  
totales$Número de tricomas,col=c("red","blue","black"))
```

```
>av2<-aov(time~(numero de  
tricomas~tratamiento+ecotipo+tratamiento:ecotipo,data=tricomas totales)
```

```
>summary(av2)
```

```
>boxplot(residuals(av2)~ecotipos*tratamiento)
```

```
>tk1<-TukeyHSD(av2,"tratamiento")
```

```
>tk2<-TukeyHSD(av2,"ecotipo")
```

```
>plot(tk1)
```

```
>plot(tk2)
```

### Anexo 5.2 Correlaciones entre heterogeneidad ambiental y resultaods CV.

```
# leer archivo de correlaciones####
```

```
Correlaciones <- read.delim("valores para correlacionar.txt", row.names=1)
```

```
View(Correlaciones)
```

```
attach(Correlaciones)
```

```
View(Correlaciones)
```

```
levels(Correlaciones)
```

```
names(Correlaciones)
```

```
# A continuación todas las variables van a tener nombres cortos.#
```

```
x<-(estacionalidad.e.la.temperatura)
```

```
a<-(CV.Forma..)
```

```
b<-(valor.de.R.del.ndice.de.disecci.n)
```

```
c<-(X.de.la.regresi.n.norma.de.reacci.n.)
```

```
d<-(CV.Tama.o.Centroide.)
```

```
e<-(CV.del.ndice.de.di..)
```

```
f<-(Valor.de.F.en.N.mero.de.hojas)
```

```
g<-(cv.n.mero.hojas)
```

```
h<-(Valor.de.F.en.N.mero.de.hojas)
```

```

i<-(CV..rea)
j<-(CV.tricomas)
K<-(Regresi.n..rea)
L<-(Valor.de.F.en.N.mero.de.tricomas)
M<-(X..regresi.n.tama.o.centroide)
N<-(PC3..)
#haciendo las correlaciones
reg1<- lm(x~a, data = Correlaciones)#heterogeneidad ambiental(X) Vs % de la regresión de
la forma
summary(reg1)
reg2<- lm(x~b, data=Correlaciones)
summary(reg2)
## Correlaciones ###
cor(x,e) # HA y Tsukaya
cor.test(x,e)
plot(x,e)
cor(x,a)
cor.test(x,a)

```



## Anexo 6. Estadística descriptiva de los tratamientos.

Tabla de promedios y desviaciones estándar de los atributos de tricomas/área, área y número de hojas.

Ecotipo	Atributo	19 °C		22°C		25°C	
		Promedio	Desv st	Promedio	Desv st	Promedio	Desv st
<b>Col</b>	Tricomas	79.64	13.19	116.46	29.75	100.35	14.91
	área	18.66	5.91	15.76	3.08	18.33	5.11
	número de hojas	19	1.195	10.86	0.967	11.392	1.64
<b>Tao</b>	Tricomas	21.31	2.20	66.38	7.24	51.05	13.71
	área	14.40	3.44	11.72	2.40	12.55	3.71
	número de hojas	19.68	1.52	13.64	1.15	14.00	1.18
<b>Kyo</b>	Tricomas	65.21	8.92	55.80	11.05	159.19	34.18
	área	17.98	4.41	13.63	5.83	17.82	3.85
	número de hojas	18.86	1.04	11.14	0.86	12.36	0.90
<b>Cvi</b>	Tricomas	195.87	34.74	210.19	27.85	161.57	48.78
	área	15.76	4.49	16.79	8.29	16.42	5.76
	número de hojas	14.3	1.4	9.1	0.4	12.2	1.6
<b>Seo</b>	Tricomas	79.7	14.2	192.2	15.2	285.4	31.8
	área	16.2	0.0	16.8	5.4	16.4	5.6
	número de hojas	12.59	2.15	13.31	2.09	11.10	1.17
<b>Ove</b>	Tricomas	64.26	10.99	81.49	13.40	//////////	//////////
	área	15.12	4.85	15.65	3.23	//////////	//////////
	número de hojas	17.55	1.82	13.82	1.76	//////////	//////////
<b>Sha</b>	Tricomas	179.57	14.96	87.29	11.68	82.15	6.98
	área	22.41	4.54	15.60	5.88	16.33	5.76
	número de hojas	11.36	1.14	7.22	0.81	7	0.00
<b>Altai</b>	Tricomas	115.13	18.99	256.02	30.98	265.97	47.07
	área	19.55	2.40	20.08	3.90	19.95	2.96
	número de hojas	18.56	1.20	11.36	0.74	11.39	1.04