



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS  
Doctorado en Ciencias Biológicas, Área Botánica

**ESTRATEGIAS DE HISTORIA DE VIDA Y SU RELACIÓN CON LA  
RESISTENCIA AL CONGELAMIENTO: PATRONES Y MECANISMOS MORFO-  
ANATÓMICOS DE EVASIÓN EN TEJIDOS VEGETATIVOS Y  
REPRODUCTIVOS**



Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la  
Universidad de Concepción para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas,  
Área Botánica

POR: LORETO VIOLETA MORALES ORELLANA

Profesor Guía: Ángela Sierra-Almeida

Noviembre 2020

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



Esta tesis fue desarrollada en el Grupo de Ecofisiología Vegetal, Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.

Dra. Ángela Sierra A. (Profesor guía)

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción

Dr. Alfredo Saldaña M. (Profesora co-guía)

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad Austral de Chile

Dr. Lohengrin Cavieres G.

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción



Dr. León Bravo R.

Facultad de Ciencias Agronómicas y Recursos Naturales  
Universidad de la Frontera

Dr. Pablo Guerrero M.

Director Programa Doctorado en Cs. Biológicas, Área Botánica  
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas  
Universidad de Concepción



## DEDICATORIA

Se la dedico a mis padres por su apoyo incondicional, por enseñarme el valor del trabajo, y por construir en mi un lazo irrompible con la naturaleza 🌿🌸

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia por su apoyo y amor incondicional.

A Santiago por estar a mi lado en las buenas y malas, por escucharme y ayudarme a ver más allá siempre.

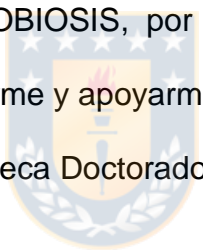
A Ángela Sierra por ser mi apoyo académico; por las oportunidades y experiencias compartidas que van mucho más allá de lo académico.

A Alfredo Saldaña por su apoyo durante el desarrollo de la tesis.

A todas las personas que pasaron por el Laboratorio, con las cuales compartimos, ideas, trabajo duro, e infinitas risas: Cami, José, Karen, Karina y en especial a Carla.

A todos los que componen ECOBIOSIS, por las discusiones académicas, los terrenos, y por siempre considerarme y apoyarme en lo que necesité.

A las fuentes de financiamiento: Beca Doctorado Nacional CONICYT N° 21140422 y FONDECYT 11150710.



## TABLA DE CONTENIDO

Comisión evaluadora .....	<b>ii</b>
DEDICATORIA .....	<b>iii</b>
AGRADECIMIENTOS .....	<b>iv</b>
TABLA DE CONTENIDO .....	<b>v</b>
ÍNDICE DE TABLAS .....	<b>vi</b>
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES .....	<b>vii</b>
RESUMEN GENERAL .....	<b>xi</b>
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	<b>1</b>
CAPÍTULO I: Does the life-history strategy determine the freezing resistance of flowers and leaves of alpine herbaceous species? .....	<b>17</b>
CAPÍTULO II: Annual and perennial high-Andes species have a contrasting freezing resistance mechanism to cope with summer frosts .....	<b>58</b>
CAPÍTULO III: Lo esencial es visible a los ojos: Importancia de la arquitectura y morfología de las flores en el patrón de propagación del hielo en plantas alpinas .....	<b>101</b>
DISCUSIÓN GENERAL .....	<b>179</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> General characteristics of the frost events that have occurred during the growing season in the central Chilean .....	<b>46</b>
<b>Tabla 1.2.</b> Taxonomic, morphological and geographical information for 22 herbaceous species from the central Chilean Andes included in the freezing resistance determinations .....	<b>47</b>
<b>Tabla 1.3.</b> Freezing resistance of leaves and flowers measured during the growing season in 10 annual and 12 perennial herb species from the Andes of central Chile. LT <sub>50</sub> are shown as mean ± standard error. Thermal differences are shown as level of significance: *p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001; and ns, not significant. Trend: L>F: leaves (L) had greater freezing resistance than flowers (F), L=F: there were no differences and L<F: flowers had greater freezing resistance than leaves .....	<b>49</b>
<b>Tabla 2.1.</b> Freezing resistance of flowers and leaves of 24 species from the central Chilean Andes measured during the growing season. Parameters: INT, ice nucleation temperature; LT <sub>50</sub> , temperature producing 50% damage and Mechanisms: FA, freezing avoidance; FT, freezing tolerance. Values are shown as mean ± standard error. LT <sub>50</sub> were obtained from Morales et al. (2020) .....	<b>59</b>
<b>Tabla 3.1.</b> Información taxonómica, estrategia de historia de vida, forma de crecimiento y tipo de flor de las 14 especies herbáceas de los Andes de Chile central en las cuales se realizaron los análisis de patrones de congelamiento mediante termografía de infrarrojos .....	<b>140</b>
<b>Tabla 3.2.</b> Variables obtenidas del análisis de los patrones de congelamiento en 14 especies herbáceas de los Andes de Chile central. INT: temperatura de nucleación del hielo. FT: Tolerante al congelamiento, FA: evasora del congelamiento. BEPH: barrera estructural de propagación de hielo, BTPH: barrera térmica de propagación de hielo. Los valores indican el promedio ± error estándar .....	<b>141</b>

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

**Fig 1.1.** Summer freezing resistance ( $LT_{50}$ ) measured in the flowers and leaves of 10 annual and 12 perennial herbs species. Boxes indicate the median (= second quartile; line inside the box) and extend from the first to the third quartile. The whiskers show at maximum the 1.5-fold interquartile range. Black circles represent mean values. Different superscripts indicate significant differences in  $LT_{50}$  between organs ( $p < 0.05$ ) ..... **52**

**Fig 1.2.** Summer freezing resistance ( $LT_{50}$ ) measured in the flowers (pink) and leaves (green) of 10 annual and 12 perennial herbs species. Black circles represent mean values and the whiskers show the standard error ..... **53**

**Fig 1.3.** Summer freezing resistance ( $LT_{50}$ ) measured in the flowers and leaves of 22 alpine species. Boxes indicate the median (= second quartile; line inside the box) and extend from the first to the third quartile. The whiskers show at maximum the 1.5-fold interquartile range. Black circles represent mean values. Different superscripts indicate significant differences in  $LT_{50}$  between organs ( $p < 0.05$ ) .... **54**

**Fig 2.1.** Percentage of total annual and perennial herbs species that showed freezing avoidance or tolerance mechanism in flowers (A) and leaves (B). **A.** Light purple: Freezing avoidant (FA); Purple: freezing tolerant (FT). **B.** Light green: Freezing avoidant (FA); Green: freezing tolerant ..... **90**

**Fig 2.2.** Freezing safety margin ( $LT_{50}$ -INT) for freezing tolerant species determined in(A) flowers of annual (light purple) and perennial (purple) species; and (B) leaves of annual (light green) and perennial (green) species. Abbreviations species: **Cf**, *Chaetanthera flabellata*; **Cl**, *Chaetanthera linearis*; **Lm**, *Lupinus microcarpus*, and **Mg**, *Microsteris gracilis*. For tolerant perennial herbs species: **As**, *Acaena splendens*; **Dg**, *Draba gilliesii*; **Hc**, *Hordeum comosum*; **Is**, *Ipheion sessile*; **Oj**, *Olsynium junceum*; **Pc**, *Perezia carthamoides*; **Sg**, *Sanicula graveolens*; **Sp**, *Senecio polygaloides*. Values are means  $\pm$  SE ..... **91**

**Fig 2.3.** Ice nucleation temperatures (INT, °C) in flowers (purple bars) and leaves (green bars) of annual species are shown in comparison to mean values (blue circles) and the minimum and maximum values (range) of freezing resistance of flowers and leaves (blue lines).. The boxes indicate the median (second quartile; line inside the box) and extend from the first to the third quartile. The whiskers show at maximum the 1.5-fold interquartile range. **Cb**, *Collomia biflora*; **Cf**, *Chaetanthera flabellata*; **Cl**, *Chaetanthera linearis*; **Lm**, *Lupinus microcarpus*; **Mg**, *Microsteris gracilis*; **Ms**, *Madia sativa*; **Pb**, *Phacelia brachyantha*; **Qp**, *Quinchamalium parviflorum*; **Se**, *Scyphanthus elegans*; **Sh**, *Schizanthus hookeri* ..... **92**

**Fig 2.4.** Ice nucleation temperatures (INT, °C) in flowers (purple bars) and leaves (green bars) of perennial species are shown in comparison to mean values (blue circles) and the minimum and maximum values (range) of freezing resistance of flowers and leaves (blue lines).. The boxes indicate the median (second quartile; line inside the box) and extend from the first to the third quartile. The whiskers show at



maximum the 1.5-fold interquartile range. **Ae**, *Alstroemeria exerens*; **As**, *Acaena splendens*; **Bc**, *Barneoudia chilensis*; **Cs**, *Calceolaria segethii*; **Dg**, *Draba gilliesii*; **Hc**, *Hordeum comosum*; **Is**, *Ipheion sessile*; **Oj**, *Olsynium junceum*; **Oc**, *Oxalis cinerea*; **Pc**, *Perezia carthamoides*; **Ph**, *Poa holciformis*; **Sg**, *Sanicula graveolens*; **Sp**, *Senecio polygaloides*; **Sph**, and *Stachys philippiana* ..... **93**

**Fig. 3.1** Representación gráfica del montaje del experimento de análisis termográfico ..... **114**

**Fig. 3.2** Imágenes representativas de las especies investigadas antes y durante el experimento de simulación de heladas. (a) Imagen digital de brotes reproductivos de las especies con inflorescencias tipo capítulo: *Chaetanthera flabellata*, *Chaetanthera linearis* y *Perezia carthamoides*; (b-g) Imágenes termográficas en las que se visualizan los eventos de nucleación como las áreas más iluminadas, las flechas azules indican la región específica donde ocurrió la nucleación del hielo. Las temperaturas de nucleación del hielo (INT °C) se indican en la parte inferior izquierda de cada imagen. El tiempo (en horas y minutos) transcurrido desde el inicio del experimento de simulación de heladas se indica en la esquina inferior derecha de cada imagen a continuación del INT ..... **157**

**Fig. 3.3** Imágenes representativas de las especies investigadas antes y durante el experimento de simulación de heladas. (a) Imagen digital de brotes reproductivos de las especies con inflorescencias tipo cima: *Phacelia brachyantha*, *Phacelia secunda* y *Scyphanthus elegans*; (b-g) Imágenes termográficas en las que se visualizan los eventos de nucleación como las áreas más iluminadas, las flechas azules indican la región específica donde ocurrió la nucleación del hielo. Las temperaturas de nucleación del hielo (INT °C) se indican en la parte inferior izquierda de cada imagen. El tiempo (en horas y minutos) transcurrido desde el inicio del experimento de simulación de heladas se indica en la esquina inferior derecha de cada imagen a continuación del INT ..... **158**

**Fig. 3.4** Imágenes representativas de las especies investigadas antes y durante el experimento de simulación de heladas. (a) Imagen digital de brotes reproductivos de las especies con inflorescencias tipo espiga: *Lupinus microcarpus* y *Stachys philippiana*; (b-g) Imágenes termográficas en las que se visualizan los eventos de nucleación como las áreas más iluminadas, las flechas azules indican la región específica donde ocurrió la nucleación del hielo. Las temperaturas de nucleación del hielo (INT °C) se indican en la parte inferior izquierda de cada imagen. El tiempo (en horas y minutos) transcurrido desde el inicio del experimento de simulación de heladas se indica en la esquina inferior derecha de cada imagen a continuación del INT ..... **159**

**Fig. 3.5** Imágenes representativas de las especies investigadas antes y durante el experimento de simulación de heladas. (a) Imagen digital de brotes reproductivos de la especie con inflorescencias tipo espiguilla *Hordeum comosum*; (b-g) Imágenes termográficas en las que se visualizan los eventos de nucleación como las áreas más iluminadas, las flechas azules indican la región específica donde ocurrió la nucleación del hielo. Las temperaturas de nucleación del hielo (INT °C) se indican

en la parte inferior izquierda de cada imagen. El tiempo (en horas y minutos) transcurrido desde el inicio del experimento de simulación de heladas se indica en la esquina inferior derecha de cada imagen a continuación del INT ..... 160

**Fig. 3.6** Imágenes representativas de las especies investigadas antes y durante el experimento de simulación de heladas. (a) Imagen digital de brotes reproductivos de las especies con inflorescencias tipo terminal: *Collomia biflora* y *Quinchamalium parviflorum*; (b-f) Imágenes termográficas en las que se visualizan los eventos de nucleación como las áreas más iluminadas, las flechas azules indican la región específica donde ocurrió la nucleación del hielo. Las temperaturas de nucleación del hielo (INT °C) se indican en la parte inferior izquierda de cada imagen. El tiempo (en horas y minutos) transcurrido desde el inicio del experimento de simulación de heladas se indica en la esquina inferior derecha de cada imagen a continuación del INT ..... 160

**Fig. 3.7** Imágenes representativas de las especies investigadas antes y durante el experimento de simulación de heladas. (a) Imagen digital de brotes reproductivos de las especies con inflorescencias tipo umbela: *Alstroemeria exerens*, *Sanicula graveolens* y *Pozoa coriacea*; (b-g) Imágenes termográficas en las que se visualizan los eventos de nucleación como las áreas más iluminadas, las flechas azules indican la región específica donde ocurrió la nucleación del hielo. Las temperaturas de nucleación del hielo (INT °C) se indican en la parte inferior izquierda de cada imagen. El tiempo (en horas y minutos) transcurrido desde el inicio del experimento de simulación de heladas se indica en la esquina inferior derecha de cada imagen a continuación del INT ..... 161

**Fig. 3.8** Temperatura de nucleación de hielo (INT) en flores (fucsia), hojas (verde claro), flores liguladas (anaranjado) y pedúnculos (verde oscuro) en especies anuales y perennes. Cada uno de los puntos (círculos de colores) representan el valor promedio y las líneas representan el error estándar (ES). Líneas horizontales: ES del tiempo (minutos) y verticales: ES de INT (°C) ..... 162

**Fig. 3.9** Temperatura de nucleación de hielo (INT) en flores (fucsia), hojas (verde claro), flores liguladas (anaranjado) y pedúnculos (verde oscuro) en especies anuales. Cada uno de los puntos (círculos de colores) representan el valor promedio y las líneas representan el error estándar (ES). Líneas horizontales: ES del tiempo (minutos) y verticales: ES de INT (°C). **Cf** *Chaetanthera flabellata*, **Cl** *Chaetanthera linearis*, **Cb** *Collomia biflora*, **Lm** *Lupinus microcarpus*, **Pb** *Phacelia brachyantha*, **Qp** *Quinchamalium parviflorum* y **Se** *Scyphanthus elegans* ..... 163

**Fig. 3.10** Temperatura de nucleación de hielo (INT) en flores (fucsia), hojas (verde claro), flores liguladas (anaranjado) y pedúnculos (verde oscuro) en especies perennes. Cada uno de los puntos (círculos de colores) representan el valor promedio y las líneas representan el error estándar (ES). Líneas horizontales: ES del tiempo (minutos) y verticales: ES de INT (°C). **Ae** *Alstroemeria exerens*, **Hc** *Hordeum comosum*, **Sg** *Sanicula graveolens*, **Sp** *Stachys philippiana*, **Pc** *Perezia carthamoides*, **Ps** *Phacelia secunda* y **Pco** *Pozoa coriácea* ..... 164

**Fig. 3.11** Delta temporal INT flores-INT pedúnculos. El delta representa el tiempo que transcurre desde la nucleación de hielo en pedúnculos hasta la nucleación de hielo en flores. Las cajas representan la mediana (línea central) y el primer y tercer cuartil (bordes de la caja). Los bigotes representan los valores máximo y mínimo dentro de 1,5 veces el rango intercuartílico. Puntos negros dentro de cada caja representan el promedio. Especies anuales (izquierda, cajas verdes): Cf, *Chaetanthera flabellata*; Cl, *Chaetanthera linearis*; Cb, *Collomia biflora*; Lm, *Lupinus microcarpus*; Se, *Scyphanthus elegans*. Especies perennes (derecha, cajas moradas): Sg, *Sanicula graveolens*; Sph, *Stachys philippiana* y, Pco, *Pozoa coriácea* ..... **165**

**Fig. 3.12** Temperatura de inflorescencias al final de la secuencia de video 1 (1h 50 min), comparación por tipo de inflorescencia. Las cajas representan la mediana (línea central) y el primer y tercer cuartil (bordes de la caja). Los bigotes representan los valores máximo y mínimo dentro de 1,5 veces el rango intercuartílico. Puntos negros dentro de cada caja representan el promedio ..... **166**

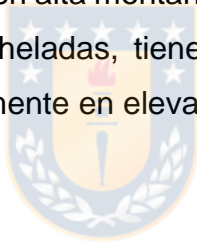
**Fig. 3.13** Diagrama resumen de las especies tolerantes y evasoras, que presentan barreras estructurales de propagación de hielo (BEPH) y/o barreras térmicas de propagación de hielo (BTPH) en sus brotes reproductivos. Cuadros morados: especies perennes; cuadros verdes: especies anuales ..... **167**

**Fig. 14** Esquema integrativo de las variables: resistencia al congelamiento, mecanismos de resistencia al congelamiento, fenología y altitud. Especies anuales (círculos): **Cb** *Collomia biflora*, **Cf** *Chaetanthera flabellata*, **Cl** *Chaetanthera linearis*, **Lm** *Lupinus microcarpus*, **Mg** *Microsteris gracilis*, **Ms** *Madia sativa*, **Pb** *Phacelia brachyantha*, **Qp** *Quinchamalium parviflorum*, **Se** *Scyphanthus elegans*, **Sh** *Schizanthus hookeri*. Especies perennes (cuadrados): **Ae**, *Alstroemeria exerens*, **As** *Acaena splendens*, **Bc** *Barneoudia chilensis*, **Cs** *Calceolaria segethii*, **Dg** *Draba gilliesii*, **Hc** *Hordeum comosum*, **Is** *Ipheion sessile*, **Oj** *Olsynium junceum*, **Oc** *Oxalis cinerea*, **Pc** *Perezia carthamoides*, **Ph** *Poa holciformis*, **Sg** *Sanicula graveolens*, **Sp** *Stachys philippiana* y **Spo** *Senecio polygaloides* ..... **196**

## RESUMEN GENERAL

En ecosistemas de alta montaña, las heladas que ocurren durante la temporada de crecimiento pueden tener consecuencias negativas para el *fitness* de las plantas. A pesar de ello, la mayoría de los estudios han evaluado las consecuencias de las heladas para las estructuras vegetativas de las plantas perennes, y no para las hojas ni para las flores de las plantas anuales. Menos se conoce acerca de los mecanismos que subyacen esta respuesta. Dado lo anterior, en la presente tesis investigamos: i. La resistencia al congelamiento de hojas y flores de especies anuales y perennes presentes en Los Andes de Chile central; ii. El tipo de mecanismo de resistencia al congelamiento que subyace esta respuesta; y iii. La importancia de las barreras estructurales/térmicas de propagación de hielo (BEPH/BTPH) como mecanismos efectivos de evasión del congelamiento en flores. La resistencia al congelamiento de las flores y hojas fue evaluada utilizando el método de fuga de electrolitos. El tipo de mecanismo de resistencia al congelamiento se determinó mediante análisis térmico. La presencia y efectividad de las BEPH/BTPH fueron evaluados mediante termografía de infrarrojo. Nuestros resultados mostraron que las especies perennes fueron más resistentes al congelamiento que las especies anuales, tanto en flores como en hojas. En especies anuales, la evasión fue el principal mecanismo de resistencia al congelamiento, mientras que en especies perennes ambos mecanismos estaban representados casi por igual. La mayoría de las especies estudiadas mostraron el mismo mecanismo de resistencia al congelamiento en flores y hojas, lo que indica una estrategia fisiológica única de resistencia al congelamiento a nivel de planta completa. No obstante, en algunas especies, es la combinación específica de estrategias fisiológicas, fenológicas, morfológicas y estructurales las que determinan qué tan resistentes son los órganos vegetativos y reproductivos al congelamiento. Lo anterior quedó de manifiesto al estudiar los patrones de formación y propagación del hielo en brotes reproductivos. Estos análisis revelaron que la presencia de BEPH y BTPH fue independiente de la estrategia de historia de vida. En especies anuales, las BEPH y BTPH fueron fundamentales para evitar el

daño por congelamiento, ya que estas especies no toleraron la formación de hielo en sus flores. En especies perennes, la contribución de estos mecanismos de evasión a la resistencia al congelamiento fue menor, ya que sus flores toleraron la formación de hielo. No obstante, estos mecanismos podrían llegar a ser cruciales como un mecanismo complementario de resistencia al congelamiento, especialmente en aquellas especies perennes que poseen un menor margen de seguridad con respecto a los eventos de heladas que ocurren en el sistema alpino. Concluimos que existe una estrecha relación entre la estrategia de historia de vida, la resistencia al congelamiento y el tipo de mecanismos de resistencia al congelamiento. Donde plantas perennes, las cuales utilizan principalmente mecanismos de tolerancia, fueron más resistentes al congelamiento en sus hojas y flores que las especies anuales. Este hallazgo sugiere que la resistencia al congelamiento podría ser un rasgo funcional importante para explicar la distribución altitudinal de especies herbáceas en alta montaña, ya que las especies anuales, las que fueron más sensibles a las heladas, tienen una distribución altitudinal más limitada, encontrándose principalmente en elevaciones más bajas.



## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

### **Resistencia al congelamiento de tejidos vegetativos y reproductivos**

En ambientes de alta montaña, uno de los principales factores abióticos que determina la distribución y el establecimiento de las plantas son las bajas temperaturas (Körner 2003). En estos hábitats fríos, los eventos de temperaturas congelantes (i.e. heladas) ocurren a través de todo el año, pero se concentran con mayor frecuencia, intensidad y duración durante el invierno. Las heladas invernales usualmente no son críticas para la supervivencia, debido a que la mayoría de las plantas se encuentran protegidas por una cubierta de nieve, bajo la cual experimentan temperaturas más moderadas y constantes (entre 0 y -5°C, Sakai & Larcher 1987; Larcher & Wagner 2009). A su vez, el alto grado de aclimatación al frío durante el invierno (i.e. incremento en la resistencia al congelamiento después de la exposición a bajas temperaturas no congelantes, Thomashow 1999) provee suficiente protección contra el daño por congelamiento en la mayoría de las especies (Taschler & Neuner 2004). Sin embargo, la situación cambia completamente y puede llegar a ser crítica durante la estación de crecimiento (i.e. post-derretimiento de la nieve). Durante esta época del año, una menor resistencia al congelamiento, provocada por la desaclimatación al frío y el desarrollo activo de nuevos tejidos, coincide con eventos impredecibles de heladas (Sakai & Larcher 1987), por lo cual, la susceptibilidad de las plantas alpinas a sufrir daño por congelamiento aumenta considerablemente.

A pesar de lo anterior, sólo estudios recientes han evaluado los efectos de las heladas que ocurren durante la estación de crecimiento en comunidades naturales de plantas (Inouye 2008; Augspurger 2009; Gerdol et al. 2013; Vitasse et al. 2014; CaraDonna & Bain 2016). Estos estudios han puesto de manifiesto que las heladas pueden alterar el desarrollo de las plantas, así como provocar daños significativos y destrucción de estructuras vegetativas y reproductivas (Inouye 2000; Augspurger 2009; Lenz et al. 2013; Vitasse et al. 2014). En tejidos vegetativos, el incremento en la exposición a las heladas puede reducir la expansión foliar y el crecimiento de los individuos (Gerdol et al. 2013), así como provocar daño en hojas y brotes apicales (Rixen et al. 2012), generando tanto una pérdida del carbono y nutrientes almacenados como de la capacidad de ganancia de carbono fotosintético (Dumlao et al. 2012). A nivel reproductivo, la exposición a las heladas puede causar daño en los tejidos y reducir la producción de flores y frutos (Bokhorst et al. 2008; Gerdol et al. 2013). En consecuencia, la pérdida de flores y las semillas debido a las heladas pueden reducir el fitness de una planta, disminuir el reclutamiento y alterar la abundancia relativa de las especies que dependen de la reproducción sexual (Bokhorst et al. 2008; Gerdol et al. 2013).

La resistencia al congelamiento durante la estación de crecimiento en los órganos vegetativos (principalmente hojas) de las plantas alpinas ha sido bastante estudiada (e.g. Squeo et al. 1996; Loik et al. 2004; Taschler & Neuner 2004; Bannister et al. 2005; Larcher et al. 2010; Sierra-Almeida et al. 2009; 2010; 2012; 2016; Sklenář et al. 2010; Venn et al. 2013; Pescador et al. 2016). Estos estudios han demostrado que las hojas de las plantas alpinas pueden resistir temperaturas



que oscilan entre  $-4^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$  en montañas templadas y de alta latitud (Sakai & Otsuka 1970; Taschler & Neuner 2004; Körner & Alsos 2009). De hecho, algunas plantas alpinas que habitan en montañas con veranos secos pueden incluso soportar temperaturas cercanas a los  $-20^{\circ}\text{C}$  (Squeo et al. 1996; Sierra-Almeida et al. 2009; Venn et al. 2013). Contrario a los bien estudiados órganos vegetativos, el conocimiento acerca de la resistencia y/o sensibilidad a las heladas de las estructuras reproductivas es limitado y se ha enfocado principalmente en plantas alpinas de los Alpes austriacos y las Montañas Rocosas (Neuner et al. 2013; Ladinig et al. 2013; CaraDonna & Bain 2016). En estos estudios, se encontró que las estructuras reproductivas fueron más sensibles a los daños causados por el congelamiento que las estructuras vegetativas (Inouye 2000; Inouye et al. 2002; Neuner et al. 2013; Ladinig et al. 2013; CaraDonna & Bain 2016). Por ejemplo, CaraDonna & Bain (2016) encontraron en las ocho especies perennes estudiadas que el tejido floral era capaz de tolerar temperaturas de entre  $-1.9^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$ . Asimismo, Ladinig & otros (2013) reportaron que la resistencia al congelamiento durante la antesis era alrededor de  $-4^{\circ}\text{C}$  en las siete especies perennes estudiadas. A pesar de estos estudios, todavía hay mucho que aprender acerca de cómo la resistencia al congelamiento puede diferir entre los órganos de las plantas, cuáles son los factores intrínsecos y/o ambientales que determinan el grado de resistencia al congelamiento y cuáles son los mecanismos de resistencia subyacentes, especialmente en estructuras reproductivas.

Algunos autores han planteado que la habilidad de una especie para resistir al estrés ambiental depende de su estrategia de historia de vida (Kooyers 2015;



Agrawal et al. 2004; Bouzid et al. 2019). Esto se debe a que la inversión energética en funciones como el crecimiento y la reproducción, determinadas por la estrategia de historia de vida, provoca que las plantas tengan menos recursos para asignar a otras funciones como la resistencia al congelamiento (un mecanismo de supervivencia: Loehle 1998; Koehler et al. 2011; Molina-Montenegro et al. 2011; Savage & Cavender-Bares 2013). Al respecto, se ha establecido que el costo asociado al crecimiento reduce la capacidad de resistencia al congelamiento de las especies, lo que provoca un compromiso (i.e. trade-off) entre la tasa de crecimiento y la resistencia al congelamiento (MacArthur 1972; Woodward & Pigott 1975; Sakai & Larcher 1987; Neuner & Beikircher 2010; Wringler 2015; Bucher et al. 2019). Por ejemplo, Neuner & Beikircher (2010) observaron que durante el crecimiento y elongación de las hojas de *Picea abies*, el comienzo del engrosamiento de la pared celular del mesófilo coincidía con la menor resistencia al congelamiento, lo que sugiere que los cambios metabólicos y citológicos que ocurren durante el crecimiento dejan poco margen para la resistencia al congelamiento de las células. Si los argumentos planteados por estos autores son válidos, entonces estrategias de historia de vida contrastantes (es decir, anuales vs. perennes) deberían tener diferencias en la capacidad de resistir el congelamiento en respuesta a sus tasas de crecimiento y a su asignación en reproducción. Por lo tanto, aquellas especies anuales con un ciclo de vida corto, altas tasas de crecimiento e inversión en reproducción, que producen órganos sobre la superficie rápidamente después del deshielo y mueren al final de la temporada de crecimiento, debiesen tener una menor resistencia al congelamiento en estructuras vegetativas y reproductivas comparadas con especies perennes, las cuales poseen ciclos de vida más largos,

menores tasas de crecimiento, e invierten recursos en órganos subterráneos para persistir más allá de la temporada de crecimiento.

Cabe señalar que la resistencia al congelamiento de flores y/u hojas en especies anuales de alta montaña ha sido rara vez estudiada (e.g. Sierra-Almeida et al. 2010; Pescador et al. 2016), lo que se debe probablemente a su menor presencia en comparación con las especies perennes (1-2% de la flora total en áreas de alta montaña son especies anuales: Billings & Mooney 1968; Billings 1974). La poca presencia de especies anuales en alta montaña presumiblemente se deba a la dificultad de completar su ciclo de vida durante una temporada de crecimiento única, corta y fría (Billings & Mooney 1968; Billings 1974). Adicionalmente, una de las posibles explicaciones de su baja abundancia y distribución altitudinal restrictiva hacia elevaciones más altas podría ser su grado de resistencia al congelamiento, pero esto no ha sido estudiado previamente. Dado este patrón de distribución, es particularmente interesante estudiar qué tan sensibles al congelamiento son las flores y hojas de las especies anuales en comparación con las herbáceas perennes que dominan los hábitats alpinos.

### **Mecanismos de resistencia al congelamiento: evasión y tolerancia**

A temperaturas bajo cero, las plantas pueden resistir el congelamiento extracelular a través de mecanismos de tolerancia o de evasión (Levitt 1980). Los mecanismos de tolerancia han sido definidos como la habilidad de las plantas para sobrevivir al congelamiento extracelular sin daño irreversible e incluye una serie de respuestas bioquímicas, reguladas por un conjunto específico de genes, que permite a las

plantas tolerar el estrés por deshidratación asociado a la presencia de hielo en sus tejidos (e.g. Modificación en la composición de lípidos de membrana; ajuste osmótico; incremento en los compuestos crioprotectores; incremento de los mecanismos antioxidantes y expresión de proteínas de estrés por frío, entre otros (Hughes & Dunn 1996; Strand et al. 2003; Uemura & Steponkus 1994; Heknevy et al. 2006). Por otra parte, los mecanismos de evasión del congelamiento son aquellos que retrasan y/o evitan la formación y propagación del hielo en los tejidos a través de la disminución del punto de congelamiento o por sobreenfriamiento (Larcher 1982). Los mecanismos de evasión han sido típicamente asociados a rasgos estructurales que determinan cuándo y dónde se forma y se propaga el hielo, por ejemplo, tamaño pequeño de las células, espacio intercelular reducido, cutículas gruesas (Gusta & Wisniewski 2013), por lo cual, se consideran menos costosos en términos de energía comparados con las respuestas inducidas. A su vez, dado que los mecanismos de evasión inhiben y/o retrasan la formación de hielo, las funciones vitales y los procesos celulares no son interrumpidos, por lo tanto son favorables para las plantas durante períodos de desarrollo y alta actividad metabólica (Sakai & Larcher 1987). Por el contrario, existe un compromiso entre el funcionamiento normal de las células y la capacidad de tolerar el hielo extracelular (Wringler 2005). A pesar de que los mecanismos de tolerancia al congelamiento son caros en términos de asignación de recursos, son adecuados para hacer frente a temperaturas de congelamiento más bajas y duraderas, en comparación con los mecanismos de evasión del congelamiento que son adecuados cuando se producen heladas leves sólo durante unas pocas horas (Goldstein et al. 1985; Rada et al. 1987; Gusta & Wisniewski 2013).

Los mecanismos estructurales de evasión en plantas han sido principalmente estudiados a través del análisis de los patrones de congelamiento en los tejidos (Hacker & Neuner 2007; 2008, Hacker et al. 2008, Neuner et al. 2010, Hacker et al. 2011, Kurprian et al. 2014). Estos análisis han revelado que una vez ocurre la nucleación, el hielo puede propagarse a través de tejidos que faciliten (e.g. tejido vascular) o impidan la propagación del hielo. Estos últimos conocidos como Barreras Estructurales de Propagación de Hielo (i.e. Ice barriers, Workmaster 1999). Las barreras estructurales de propagación de hielo (BEPH), previenen y/o retrasan la propagación del hielo desde el tallo hacia órganos reproductivos (brotes o flores) permitiendo el sobreenfriamiento de estos tejidos y se ubican en áreas claves, como la porción del tallo que soporta el brote reproductivo o la base de las flores. Las BEPH han sido estudiadas en plantas de interés comercial, principalmente en árboles frutales (Ishikawa & Sakai 1981; Ashworth et al. 1985; Ishikawa & Sakai 1985; Ashworth et al. 1992; Stone et al. 1993; George et al. 1982; Workmaster 1999) y recientemente han sido descubiertas en especies alpinas (Hacker et al. 2011; Kuprian et al. 2014; Kuprian et al. 2016). Por ejemplo, Kuprian & colaboradores (2014) encontraron que la BEPH ubicada en la base del pedicelo (en la unión anatómica de los brotes vegetativos y reproductivos), evita la propagación de hielo desde el tallo hacia los brotes reproductivos de *Loiseleuria procumbens* y otras especies leñosas durante los meses de verano. La barrera permite que los brotes reproductivos permanezcan sobreenfriados durante una helada nocturna y sobrevivan ilesos a pesar del congelamiento de los tejidos vegetativos. Mientras que los órganos vegetativos se congelaron entre -4,7 y -5,7°C, los brotes reproductivos

fueron capaces de sobreenfriarse hasta un rango de  $-7,2^{\circ}\text{C}$  a  $-18,2^{\circ}\text{C}$ , y en algunos casos incluso por debajo de los  $-22^{\circ}\text{C}$  (Kuprian et al. 2014).

A pesar de la importancia que pueden llegar a tener estas BEPH en la resistencia de las plantas al congelamiento, el fundamento que subyace la presencia de estas barreras estructurales aún no ha sido completamente esclarecido. Sin embargo, algunos autores han planteado que la naturaleza de estas barreras se relaciona a rasgos específicos en términos de la estructura, compartimentalización y anatomía de los tejidos (Wisniewski et al. 2009; Gusta & Wisniewski 2013; Wisniewski et al. 2014). A pesar de los escasos análisis anatómicos que se han realizado en las BEPH, ha existido convergencia en una serie de rasgos los cuales apuntan hacia la reducción, tanto del contenido de agua como del espacio disponible para la formación de hielo en los tejidos. Las características de los tejidos de la BEPH incluyen ausencia de tejido vascular maduro y/o ausencia de conexión vascular, células pequeñas empaquetadas con paredes celulares gruesas que están desprovistas de vacuolas y espacios intercelulares, regiones de tejidos seco, reducción en el diámetro de los poros en las membranas de las punteaduras y la presencia de sustancia hidrófobas (Ishikawa & Sakai 1981; Ashworth 1984; Quamme 1978; Quamme 1995; Kuprian et al. 2016).

A nivel de planta completa, la arquitectura de la planta, definida como la organización tridimensional del cuerpo de la planta, incluido el patrón de ramificación, así como el tamaño, la forma y la posición de las hojas y los órganos florales (Reinhardt & Kuhlemeier 2002) ha sido descrita como otra de las posibles

maneras para evitar los efectos de las temperaturas bajo cero (Nobel & Smith 1983), y ha sido clasificada dentro de los mecanismos de evasión estructural. Un claro ejemplo de lo anterior son las plantas en cojín, las que, debido a su baja estatura y estructura compacta, son eficientes trampas de calor, generando un desacoplamiento térmico entre las hojas y la temperatura del aire de hasta 20°C (Körner 2003). Por ejemplo, Hacker y colaboradores (2011) al analizar los patrones de congelamiento de 4 plantas en cojín alpinas: *Saxifraga bryoides*, *S.caesia*, *S. moschata* y *Silene acaulis*, descubrieron que cada brote reproductivo necesitaba un evento de nucleación de hielo independiente para iniciar el congelamiento en las cuatro especies estudiadas. Los autores propusieron que el patrón de congelamiento es consecuencia del gradiente de temperatura que se produce naturalmente dentro de los cojines, que parecía interrumpir la propagación del hielo térmicamente (i.e Barreras térmicas de propagación hielo (BTPH), Fuller & Wisniewski 1998; Körner et al. 2003; Hacker et al. 2011). En estas especies, el sobreenfriamiento es imperativo para hacer frente al congelamiento, debido a que la formación de hielo causa un daño letal en los órganos reproductivos.

A pesar de que la presencia de BTPH puede no tener un efecto directo sobre la resistencia al congelamiento de las estructuras reproductivas, sí puede determinar la velocidad con la que el hielo se forma y alcanza estos tejidos, pudiendo influenciar su capacidad de sobreenfriamiento. Este desfase temporal en la nucleación del hielo, sumado a la presencia de BEPH, podrían ser sumamente importantes y suficientes (en términos de tiempo) para hacer frente a eventos azarosos y esporádicos de congelamiento, como son las heladas estivales,

especialmente en aquellas especies que no tienen la capacidad de tolerar la formación de hielo en sus flores. En este sentido y basados en el argumento de la asignación diferencial de recursos es de esperarse, que plantas con estrategias de historia de vida contrastantes utilicen diferentes mecanismos de resistencia al congelamiento de acuerdo a la disponibilidad energética y al costo del mecanismo. Por ejemplo, en las especies anuales que tienen una alta tasa de crecimiento en la fase pre-reproductiva e invierten la mayor parte de sus recursos energéticos y minerales en la reproducción (Bazzaz et al. 1987; Hancock & Pritts 1987; Garnier 1992), se espera que utilicen principalmente mecanismos de evasión al congelamiento para hacer frente a los eventos de heladas, lo que a su vez puede liberar la necesidad de invertir en mecanismos de tolerancia (Kooyers 2015). Dado que un mecanismo de evasión implica un menor costo de energía, las plantas anuales evitarían y/o disminuirían el compromiso con las altas demandas de recursos para el rápido crecimiento y reproducción. Por el contrario, en las plantas perennes que tienen un uso más conservador de la energía debido a un período de crecimiento más largo y una tasa de crecimiento relativo más baja que las plantas anuales (Bazzaz et al. 1987; Bazzaz & Morse 1991; Garnier 1992), es de esperarse que utilicen más comúnmente mecanismos de tolerancia en sus órganos, lo que les permitiría aumentar su supervivencia a largo plazo (Bouzid et al. 2019).

### **Planteamiento del problema**

En ambientes de alta montaña, las bajas temperaturas y la acumulación de nieve durante el invierno restringen el crecimiento y reproducción de las plantas a los meses de primavera y verano, por lo cual la floración debe ser completada y estar

asegurada suficientemente temprano para permitir la maduración de los frutos y la dispersión de las semillas (Arroyo et al. 1981). Este periodo tiende a disminuir en longitud a medida que aumenta la altitud, debido principalmente a una menor temperatura y a una mayor duración de la nieve (Arroyo et al. 1981; Wheeler et al. 2014). En los Andes de Chile central, hábitat mediterráneo de gran altitud, las estrategias y patrones fenológicos generales de las plantas están determinados además por la disponibilidad hídrica derivada de las precipitaciones invernales y a la vez, la presión por florecer durante un período favorable para la actividad de los insectos (Arroyo et al. 1981). A pesar de estas restricciones temporales, abióticas y a los altos costos energéticos asociados, una gran proporción de las plantas alpinas que habitan los Andes en Chile central dependen de la reproducción sexual (Arroyo et al. 1985). Incluso a mayores altitudes, las plantas han desarrollado estrategias para asegurar su éxito reproductivo, a través del incremento en los periodos de floración y a un desarrollo floral más lento (Arroyo et al. 1981; Torres-Díaz et al. 2011; Pacheco et al. 2016). A diferencia del patrón global, en el que las plantas anuales son raras en los hábitats de alta montaña (1-2% de la flora; Billings & Mooney 1968; Billings 1974; Chabot & Billings 1972), en los Andes de Chile central, las plantas anuales son particularmente más abundantes (representan el 10% de la cubierta vegetal total en el cinturón subandino, Arroyo et al. 1981; Cavieres et al. 2000), lo que convierte a este ecosistema alpino en un escenario atractivo para comparar los patrones de resistencia al congelamiento y los mecanismos subyacentes entre especies anuales y perennes. A pesar de lo anterior, no existe nada de información acerca de la resistencia al congelamiento de las estructuras reproductivas de las especies de plantas que habitan los Andes de Chile central y



menos se conoce acerca cómo la estrategia de historia de vida de las especies influencia esta respuesta. Dado lo anterior, en el siguiente proyecto proponemos estudiar **i) si la estrategia de historia de vida determina la resistencia al congelamiento de tejidos vegetativos (hojas) y reproductivos (flores) en especies de plantas que habitan los Andes de Chile central y ii) cómo la estrategia de historia de vida de las especies determina el tipo de mecanismo de resistencia al congelamiento subyacente (Evasión vs. Tolerancia).**

Por otra parte, y dado que algunos estudios han demostrado que la formación de hielo dentro de los tejidos reproductivos causa inmediatamente daño en las especies alpinas (Hacker et al. 2011; Ladinig et al. 2013; Kuprian et al. 2014), aquellos mecanismos de evasión que permiten el sobreenfriamiento de los tejidos, debieran tener un rol fundamental en la protección de las estructuras reproductivas frente a las heladas (Kuprian et al. 2014). Dado lo anterior, proponemos determinar **iii) en qué grupo de plantas es más frecuente encontrar barreras estructurales de propagación de hielo (BEPH) y barreras térmicas de propagación de hielo (BTPH) (Anuales vs. Perennes) y iv) cómo estas barreras se relacionan con la resistencia al congelamiento de las estructuras reproductivas.**

Los resultados de esta investigación añadirán a nuestro entendimiento qué tan susceptibles se encuentran los distintos tejidos dentro de una planta al daño por congelamiento, permitiéndonos comprender el fenómeno de resistencia de una manera integral y a nivel de planta completa. En el siguiente trabajo, se dará especial énfasis a la resistencia al congelamiento de las estructuras reproductivas,

con el fin de determinar si las heladas que ocurren durante la temporada de crecimiento constituyen un riesgo para la reproducción en plantas andinas de Chile central. A su vez, nos permitirá determinar si la estrategia de historia de vida de las especies modula el grado de resistencia al congelamiento y los mecanismos que lo subyacen en estructuras vegetativas y reproductivas. Sumado a lo anterior, esta investigación agregará conocimiento a la teoría general respecto a los mecanismos que subyacen la protección de las estructuras reproductivas, específicamente la presencia y efectividad de las barreras estructurales de propagación de hielo y su efecto sobre la capacidad de sobreenfriamiento de los tejidos. Finalmente, este estudio nos permitirá comprender, de una manera más clara, los procesos de propagación de hielo y la importancia de la arquitectura y morfología de los tejidos sobre el desacople térmico y la física de congelamiento (barreras térmicas de propagación de hielo).



## **Preguntas, hipótesis y objetivos de la investigación**

***Pregunta 1: ¿La estrategia de historia de vida (LHS) determina la resistencia al congelamiento de tejidos vegetativos (hojas) y reproductivos (flores)?***

Hipótesis: Dado el patrón diferencial en la asignación de recursos hacia la reproducción y crecimiento entre hierbas anuales y perennes, se espera que la resistencia al congelamiento dependa de LHS, donde las hierbas anuales debiesen tener una menor resistencia al congelamiento que las hierbas perennes, tanto en órganos vegetativos como reproductivos.

***Pregunta 2: ¿Existen diferencias en el tipo de mecanismo de resistencia al congelamiento entre hierbas anuales y perennes?***

Hipótesis: Se espera que el tipo mecanismo de resistencia al congelamiento (evasión vs. tolerancia) dependa de LHS, donde hierbas anuales de vida corta debiesen utilizar mecanismos de evasión para resistir el congelamiento, mientras que hierbas perennes de larga vida debiesen utilizar mecanismos de tolerancia para resistir el congelamiento.

***Pregunta 3: ¿En qué grupo de plantas es más frecuente encontrar barreras estructurales de propagación de hielo y barreras térmicas de propagación de hielo y cómo éstas se relacionan con la resistencia al congelamiento de las estructuras reproductivas?***

Hipótesis: Se espera que exista una mayor frecuencia de barreras estructurales de propagación de hielo (BEPH) y barreras térmicas de propagación de hielo (BTPH) en especies anuales respecto a especies perennes, confiriéndoles una mayor resistencia al congelamiento en tejidos reproductivos.



## **Objetivo general**

Determinar si las heladas que ocurren durante la temporada de crecimiento constituyen un riesgo para la reproducción en plantas andinas de Chile central y establecer la importancia de la arquitectura y morfoanatomía de brotes reproductivos como un mecanismo efectivo de evasión del congelamiento a través del impedimento o retraso de la propagación del hielo hacia las flores.

## **Objetivos específicos**

- Evaluar si existen diferencias en la resistencia al congelamiento entre estructuras vegetativas y reproductivas, y determinar si la estrategia de historia de vida modula estas diferencias.
- Determinar si existen diferencias en el tipo de mecanismo de resistencia al congelamiento (Evasión vs. Tolerancia) en tejidos vegetativos y reproductivos de hierbas anuales y perennes.
- Determinar la frecuencia y efectividad de barreras estructurales de propagación de hielo y barreras térmicas de propagación de hielo en hierbas anuales y perennes.
- Evaluar la relación entre la presencia de BEPH/BTPH y la resistencia al congelamiento de las flores de hierbas anuales y perennes.

## CAPÍTULO I

### **Does the life-history strategy determine the freezing resistance of flowers and leaves of alpine herbaceous species?**

Loreto V. Morales\*<sup>1</sup>, Carla Alvear<sup>1</sup>, Camila Sanfuentes<sup>2,3</sup>, Alfredo Saldaña<sup>1</sup> and  
Ángela Sierra-Almeida<sup>1</sup>

#### **Manuscrito publicado en Alpine Botany:**

Morales, LV., Alvear, C., Sanfuentes, C. et al. Does the life-history strategy determine the freezing resistance of flowers and leaves of alpine herbaceous species? *Alp Botany* 130, 157–168 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00035-020-00236-5>



## ABSTRACT

In high-mountain habitats, summer frost events can have negative consequences for plant fitness. Despite this, most studies have evaluated the consequences of frosts for vegetative structures of perennial plants, and neither for leaves nor for flowers of annual plants. We hypothesize that the degree of freezing-resistance of flowers and leaves of a species depends on its life-history strategy (LHS), and is probably the consequence of a trade-off between growth/reproduction and the cost of the freezing resistance. Specifically, flowers and leaves of short-lived annual species should be less freezing-resistant than those of perennial plant species. We compared the freezing resistance of flowers and leaves of 10 annual and 12 perennial plant species from the Andes of central Chile using the electrolyte leakage method. Temperature damage for 50% tissue ( $LT_{50}$ ) of annual species was  $-9.6^{\circ}\text{C}$  in flowers and  $-11.9^{\circ}\text{C}$  in leaves. In perennial species,  $LT_{50}$  was similar in flowers ( $-12.3^{\circ}\text{C}$ ) and leaves ( $-12.5^{\circ}\text{C}$ ). Despite that, these differences were not significant (except the flowers of annual species), we found remarkable differences between LHS when freezing resistance was analyzed species by species. Like this, 58% and 83% of perennial species resist temperatures  $\leq -10^{\circ}\text{C}$  in their flowers and leaves, respectively, compared with only 30% and 40% of annual species. Additionally, in most of the species, the freezing resistance of leaves was greater than that of flowers, being this proportion greater in annual (58%) than in perennial species (43%). Thus, we concluded that the degree of freezing resistance depends on the LHS. Such that annual species which are less freezing resistant than perennial

species, have an infrequent occurrence and a distribution restricted to low elevation in high-mountain habitats.

**Keywords:** alpine plants, freezing damage, growing season, reproduction.





## INTRODUCTION

In high-mountain habitats, low temperatures are one of the main abiotic factors determining plant distribution (Woodward 1987). In these cold habitats, frost events occur throughout the year, but the negative consequences for plants are greater in spring and summer (Körner 2003). During these periods, plants exhibit their lowest degree of freezing resistance, apparently caused by a compromise between resource allocation to tissue protection and growth/reproduction (Larcher 2003). Therefore, unpredictable frost events during the growing season can have important ecological consequences for high-mountain plants.

Growing season frosts can alter plant development and cause significant damage in vegetative and reproductive structures (Inouye 2000; Inouye 2008; Augspurger 2009; Gerdol et al. 2013; Lenz et al. 2013; Vitasse et al. 2014; CaraDonna and Bain 2016). In vegetative structures, an increase in frost exposure can reduce foliar expansion and growth (Gerdol et al. 2013), as well as causing damage to leaves and apical shoots (Rixen et al. 2012). This can cause a loss in stored carbon and nutrients as well as a reduction in the photosynthetic carbon gain capacity (Dumlao et al. 2012). In reproductive structures, frost exposure can cause tissue damage and reduce flower and fruit production (Bokhorst et al. 2008; Gerdol et al. 2013). Consequently, the loss of flowers and seeds due to frost, may reduce plant fitness, decrease recruitment and alter the relative abundance of those plant species that depend upon sexual reproduction (Bokhorst et al. 2008; Gerdol et al. 2013).

Regardless of the high frost sensibility of some tissues in alpine species, studies have shown that a huge amount of plants inhabit high mountains are freezing resistant during the growing season. Specifically, freezing resistance of vegetative structures during growing season has been well studied (e.g. Squeo et al. 1996; Loik et al. 2004; Taschler and Neuner 2004; Bannister et al. 2005; Larcher et al. 2010; Sierra-Almeida et al. 2009; 2010; 2012; 2016; Sklenář et al. 2010; Venn et al. 2013; Pescador et al. 2016). These studies have demonstrated that leaves of alpine plants could resist freezing temperatures ranging from  $-4^{\circ}\text{C}$  to  $-10^{\circ}\text{C}$  in temperate and high latitude mountains (Sakai and Otsuka 1970; Taschler and Neuner 2004; Körner and Alsos 2009). Actually, some alpine plants that inhabit in mountains with dry summers can even withstand temperatures close to  $-20^{\circ}\text{C}$  (Squeo et al. 1996; Sierra-Almeida et al. 2009; Venn et al. 2013). Contrary to the well-studied vegetative structures, our knowledge about freezing resistance of reproductive structures in alpine plants is limited and have been focused mainly in alpine plants from the Austrian Alps and Rocky Mountains (Neuner et al. 2013; Ladinig et al. 2013; CaraDonna and Bain 2016). In these studies, reproductive structures were found to be more sensitive to freezing damage than vegetative structures. For example, CaraDonna and Bain (2016) found in the eight studied perennial species that floral tissue was able to tolerate freezing temperatures between  $-1.9^{\circ}\text{C}$  and  $-10^{\circ}\text{C}$ . Likewise, Ladinig et al (2013) reported that the mean  $\text{LT}_{50}$  was around  $-4^{\circ}\text{C}$  during bolting and anthesis in seven perennial species. Despite these studies, there is still much to be learned about how freezing resistance may differ among plant organs and which could be the intrinsic and/or environmental factors that could determine the degree of freezing resistance, especially in reproductive structures.

Some authors assume an inverse relationship between the freezing resistance ability of a species and its growth rate during summer (Sakai and Larcher 1987; Neuner and Beikircher 2010; Wringler 2015; Bucher et al. 2019). For example, Bucher et al (2019) reported a negative relationship between freezing resistance and specific leaf area (a proxy of growth rate), confirming this trade-off and, as stated by the authors, it is also in line with plant economics spectra (Wright et al. 2004; Reich 2014; Díaz et al. 2004). If the arguments raised by these authors are valid, then contrasting LHS (i.e. perennial vs. annual) should have differences in the ability to resist freezing temperatures in vegetative and reproductive structures in response to their inherent growth rates. Therefore, annual species with short lifespans, high growth rates, which produce aboveground organs rapidly after snowmelt and die at the end of the growing season, are expected to be less freezing resistant than perennial species with a long lifespan, low growth rate, which invests resources in underground organs to persist beyond the growing season.

It is noteworthy that the freezing resistance of flowers and/or leaves in annual species, inhabiting high mountain ecosystems, has been rarely studied (e.g. Sierra-Almeida et al. 2010; Pescador et al. 2016). The lack of studies dealing with the freezing resistance of annual species may be due to their lower presence compared to perennial species (1-2% of the total flora in high mountain areas are annual species: Billings and Mooney 1968; Billings 1974), which is presumably due to the difficulty of completing their life cycle during a single, short, and cold growing season (Billings and Mooney 1968; Billings 1974). Additionally, one of the possible

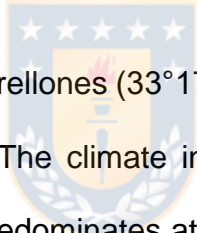
explanations of their low abundance and restrictive altitudinal distribution towards higher elevations could be their degree of freezing resistance, but this has not been previously studied. Given this distributional pattern, it is particularly interesting to study how much sensitive to freezing are flowers and leaves of annual species in comparison to herbaceous perennial that dominate alpine habitats.

In the central Chilean Andes, as occurs in other seasonal alpine habitats worldwide, plants' growth and reproduction are restricted to spring and summer, when the snow has melted and temperatures are warm (Arroyo et al. 1981; Cavieres et al. 2006; Cavieres et al. 2007). Moreover, this high elevation zone is influenced by a Mediterranean climate type, which imposes soil moisture limitations for plants, resulting in an even shorter period for growth and reproduction (Arroyo et al. 1981; Sierra-Almeida et al. 2016). Despite these abiotic constraints a great proportion of the alpine plants in the Andes of central Chile depends highly on sexual reproduction (Arroyo et al. 1981). Even at higher elevations, plants have developed strategies to increase their sexual reproduction success, such as long flowering periods and slower floral development (Arroyo et al. 1981; Torres-Díaz et al. 2011; Pacheco et al. 2016). Unlike the global pattern, where annual plants are rare in high-mountain habitats (Billings and Mooney 1968; Billings 1974; Chabot and Billings 1972), in the central Chilean Andes, annual plants are particularly abundant (representing 10% of total plant cover at the Sub-Andean belt, Arroyo et al. 1981; Cavieres et al. 2000), turning this alpine ecosystem into an attractive scenario to compare the freezing resistance of annual and perennial species.

Thus, we investigated the summer freezing resistance of flowers and leaves of 10 annual and 12 perennial herb species inhabiting the Central Chilean Andes. We expected that freezing resistance depends on LHS, where annual herbs should have a lower freezing resistance than perennial herbs in flowers and leaves. Additionally, we explored and discussed the differences in the freezing resistance of flowers and leaves and how plant traits as flower and leaf morphology, phenology, and elevation distribution determine the freezing resistance.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study site and species**

This study was carried out near Farellones (33° 17'S 70° 25'W), in the central Chilean Andes, 50 km east of Santiago.  The climate in this area is alpine with a strong Mediterranean influence, which predominates at lower elevations, generating a dry growing season (Santibañez and Uribe 1990). This area is characterized by the dominance of shrubs and dwarf shrubs such as *Anarthrophyllum cumingii*, *Chuquiraga oppositifolia* and *Tetraglochin alatum*, perennial herbs such as *Alstroemeria exerens* and *Stachys philippiana*, and annual species such as *Chaetanthera* spp, *Collomia biflora* and *Microsteris gracilis* (lower Andean vegetation belt, Teillier et al. 2011).

The growing season begins with the snowmelt in September-October and ends in April with the first snowfall (Sierra-Almeida and Cavieres 2012). During this period, the daily mean air temperature is 15.6° C, with daily maximum and minimum

temperatures of 32 and 5°C, respectively (average temperature between 2200 and 2800 m above sea level; Table 1). Frost events are distributed throughout the growing season, though they are more frequent at the beginning and end of this season (October-November and March). There is a high inter-annual variation in the number and intensity of frost events, ranging from 2 to 59 frost events per growing season (2009-2010). The duration of these frost events is also highly variable, ranging from 1h to 14h (2011-2012), and air temperatures can drop below -10°C (Table 1, Fig. S1).

A total of 22 species were studied, including 10 annual and 12 perennial herbaceous species (Table 2). Plant material for each studied species was collected in the Sub-Andean belt (2100- 2500 m, Cavieres et al. 2000), with the exception of *Alstroemeria exerens*, *Draba gilliesii*, *Hordeum comosum*, *Ipheion sessile* and *Perezia carthamoides* which were collected at 2800 m above sea level, in the lower range of the lower-Andean belt (2600-3400 m, Cavieres et al. 2000). The studied species were primarily selected based on their observed abundance in the plant herbaceous community. Then, we considered the morphological characteristics of vegetative (leaves) and reproductive structures (flowers/inflorescences), which should be present simultaneously to determine their respective freezing resistances (Table 2). Plant material was collected between 17-Oct-2017 and 01-Jan-2018, coinciding with the flowering peak of each studied species (see Table 2 for collection date).

### **Plant tissue collection**

Flowers and leaves were collected from individual plants selected randomly (n = 7 per species). Plant tissue of all of the studied species was collected at the same developmental stage. For reproductive structures, flowers and inflorescence were collected during anthesis (corolla open and flower sexually functional; Neuner et al. 2013). For vegetative structures, only healthy, mature and fully-expanded leaves were collected. Seven flowers and 7 leaves were collected from each individual plant; each one was covered with a moist paper towel and immediately placed inside a plastic sealed bag (total = 49 flowers and 49 leaves per species). In cases where some individuals did not have enough flowers and leaves, the plant samples were completed with tissue obtained from the closest individual. Plant samples were stored inside a cooler to avoid changes in the tissue water status. Within 2h of collection, all plant samples were transferred to a refrigerator at 4°C until freezing treatments started. To avoid senescence and dehydration of the plant samples, freezing resistance determinations were carried out in a field laboratory within 24h after sample collection.

### **Frost experiments**

A cryostat (F34-ME, Julabo Labortechnik GmbH, Germany) was used to expose the flowers and leaves to 6 independent freezing treatments: -5, -7.5, -10, -12.5, -15 and -20°C. The selection of the freezing treatments was based on earlier frost records during the growing season (Table 1, Fig. S1) and previous data on the freezing resistance of leaves for species in the study area (Sierra Almeida et al. 2009; 2010; 2016). For each of the six freezing treatments and the control, 7 single flowers or capitula (Table 2; *C. flabellata*, *C. Linearis*, *M. sativa* and *P. carthamoides*) and 7

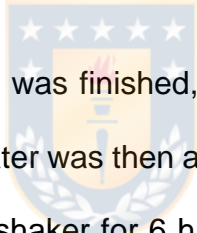
leaves from different individuals were used for each species. All the flowers were cut near the base of the pedicel, below the receptacle and the leaves were cut near the base of the petiole. Detached flowers and leaves were placed inside hermetically sealed Falcon tubes (15 or 50 ml depending on the size of the sample) and put inside the cryostat. For the studied species, flower and leaf size is a much-conserved trait. Therefore, the amount of tissue placed inside Falcon tubes was standardized by size, using flowers and leaves of similar size.

Frost simulations started at 0°C and at a cooling rate of -5 K<sup>h</sup><sup>-1</sup> every target temperature was reached within 1-4 hours. After this, the samples were kept for 2 h at the target temperature and were then returned to 0°C at a thawing rate of 5 K<sup>h</sup><sup>-1</sup> inside the cryostat. The cooling rate was selected according to the maximum cooling rates during natural summer freezing events in the Central Chilean Andes, obtained from previous weather station recordings located 1.5 meters above the ground. Likewise, the time of exposition of the samples to the target temperature was selected to conform to summer frost characteristics in the study area. In natural frosts, when the minimum temperature is reached, it is maintained for approximately two hours, then the temperature starts to rise again (Fig. S1). It should be noted that the highest target temperature (-5°C) keeps the plants for 4 h at temperatures below zero, while the lowest target temperature (-20°C) keeps them at temperatures below zero for 10 h, which almost entirely cover the variations in the frost duration for the study area (Table 1).

### **Assessment of freezing damage**



The temperature that caused 50% damage ( $LT_{50}$ ) in flowers and leaves was estimated by using the membrane electrolyte leakage method. This method is based on the increase in electrolyte leakage (mainly  $K^+$ ) induced by the loss of integrity and stability of the cell membranes (Wilner 1960; Lipp et al. 1994). This method was chosen over others (e.g. photoinactivation, visual inspection) because it allows assessment and comparison of the freezing damage of both plant structures: flowers and leaves.  $LT_{50}$  in flowers was estimated in the whole functional structure, as fertile and infertile tissues play important roles in promoting/protecting sexual reproduction (e.g. corolla has a role in the attraction of pollinators and herbivory defense), and seed production (i.e. stamens and pistils).




Once each temperature treatment was finished, the tubes were removed from the cryostat and 10 ml of deionized water was then added to each tube. The tubes were kept at ambient temperature in a shaker for 6 h (18°C approximately). Afterwards, the electrical conductivity ( $EC$ ) of the solution was measured with a conductance/resistance meter (Hanna HI 8733, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA). After measuring the  $EC$ , the tubes were enclosed in a boiling water bath for 30 min to obtain the maximum ion leakage by freezing-induced damage. Boiling plant tissue to achieve complete electrolyte leakage is a conventional procedure for determining tissue freezing resistance with the membrane leakage method (e.g. Wilner 1960; Arias et al. 2015; Zhang et al. 2016).

The relative electrical conductivity ( $REC$ ), an indicator of membrane electrolyte leakage, was calculated for each sample as a percentage:

$$REC = (EC \text{ after freezing treatment} / EC \text{ after boiling}) \times 100$$

In addition, given that the samples manipulation and the incubation in deionized water can alter the *REC*, a control treatment was carried out for each species. Falcon tubes with tissue samples (7 replicates per tissue incubated separately in 10 ml of deionized water) were incubated at ambient temperature for 10 h, the time needed to achieve the longest freezing treatment (-20°C). After that, the same procedure used to measure the relative *EC* after freezing treatments was used to obtain the control treatment's *EC*. Then, a corrected relative *EC* was calculated as follows:


$$\text{Corrected REC} = \text{REC of the freezing treatment} - \text{REC of the control treatment.}$$

The temperature that produced 50% damage ( $LT_{50}$ ) was determined by linear interpolation using the temperature that caused the highest percentage of electrolyte leakage (*Corrected REC*) of <50% and the temperature that caused the lowest *corrected REC* of >50%.

### **Data Analysis**

The differences in freezing resistance ( $LT_{50}$ ) of flowers/leaves between annual and perennial herbs species were evaluated using the non-parametric Kruskal-Wallis because  $LT_{50}$  data did not comply with the required assumptions of parametric models (bimodal distribution). Given that 22 species with different morphological and phenological characteristics were included in this study, a linear model (LM) was

used to determine the extent of the relationship between the flower/leaf freezing resistance and the independent variables: life-history strategy (LHS), flower and leaf type, altitudinal distribution, elevation and date of measurement (Table S1 and Table S2). We assumed a Gaussian distribution and checked the normal distribution of model residuals to confirm goodness of fit. We also checked the plotted residuals of the model to ensure homoscedasticity. All the statistical analysis was performed in RStudio (Version 1.1.463 – © 2009-2018 RStudio, Inc.).

## RESULTS

### Effect of LHS on the freezing resistance of flowers and leaves

Linear model analysis indicated that LHS significantly affects the freezing resistance of flowers and leaves ( $p < 0.0001$ ) (Table S1, Table S2). When all species were taken together, mean  $LT_{50}$  of annual species was  $-9.6^{\circ}\text{C} \pm 0.6^{\circ}\text{C}$  and  $-11.9 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ , in flowers and leaves, respectively. In perennial species, mean  $LT_{50}$  for flowers was  $-12.3 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ , meanwhile for leaves was  $-12.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  (Fig.1).  $LT_{50}$  of flowers differed significantly between annual and perennial species ( $p < 0.0001$ ).  $LT_{50}$  of flowers was on average 2.7K lower (more negative) in perennial than in annual species (Fig.1). However, there were no significant differences in the  $LT_{50}$  of leaves between annual and perennial plants.

It is important to note that freezing resistance among species in both LHS differed significantly (Table 3; Fig. 2). In annual species,  $LT_{50}$  of flowers ranged from  $-5.5^{\circ}\text{C}$  (*P. brachyantha*) to  $-20^{\circ}\text{C}$  (*C. linearis*), meanwhile  $LT_{50}$  of leaves ranged from  $-6.6^{\circ}\text{C}$

(*C. biflora*) to  $-20^{\circ}\text{C}$  (*C. flabellata*, *C. linearis* and *L. microcarpus*). In perennial species,  $\text{LT}_{50}$  of flowers ranged from  $-6.2^{\circ}\text{C}$  (*A. exerens*) to  $-19^{\circ}\text{C}$  (*D. gilliesi*), meanwhile  $\text{LT}_{50}$  of leaves ranged from  $-7.3^{\circ}\text{C}$  (*P. holciformis*) to  $-20^{\circ}\text{C}$  (*A. splendens*). Notwithstanding that  $\text{LT}_{50}$  of flowers and leaves ranged similar values in annual and perennial species, when species were analysed case by case, meaningful patterns come to light. Specifically, perennial species had a greater safety margin for frosts than annual species, both in their flowers and leaves. 58% and 83% of perennial species resisted temperatures  $\leq -10^{\circ}\text{C}$  in their flowers and leaves, respectively (Fig. 2). In annual species, only 30% and 40% of the studied species resisted temperatures  $\leq -10^{\circ}\text{C}$  in flowers and leaves, respectively (Fig. 2).

### **Freezing resistance differences between flowers and leaves**

Interestingly, we observed significant differences in the mean  $\text{LT}_{50}$  between flowers and leaves (Fig. 3; Table 3).  $\text{LT}_{50}$  of leaves was 1.2K lower (more negative) than  $\text{LT}_{50}$  of flowers ( $p < 0.05$ ) when all species were evaluated together. This general result coincided with the observed in the majority of the studied species, wherein 56% of annual and 42% of perennial studied species, leaves were, on average, 5.6K more freezing resistant than flowers ( $\text{LT}_{50}$  difference ranged from 2.1K in *S. philippiana* to 10.1K in *L. microcarpus*). Moreover, in 22% of annuals and 25% of perennial studied species flowers and leaves resisted similar freezing temperatures (Table 3). Interestingly, in 22% of annuals and 33% of perennial studied species flowers were on average 5.2K more freezing resistant than leaves, with a  $\text{LT}_{50}$  difference of 2.5K in *C. biflora* to 9.1K in *M. gracilis* (Table 3).

Linear model analysis indicated that the 5 predictors (i.e. LHS, flower and leaf type, altitudinal distribution, elevation, and date of measurement) explained 66% and 75% of the variance of flowers and leaves freezing resistance, respectively ( $p < 0.0001$ ). In flowers, the date of measurement ( $R^2 = 0.29$ ,  $F_{(3,111)} = 32.4$ ,  $p < 0.0001$ ) and the altitudinal distribution ( $R^2 = 0.14$ ,  $F_{(1,111)} = 47.5$ ,  $p < 0.0001$ ) explained most of the variance. In leaves, the leaf type ( $R^2 = 0.55$ ,  $F_{(5, 93)} = 40.9$ ,  $p < 0.0001$ ) and the date of measurement ( $R^2 = 0.09$ ,  $F_{(3, 93)} = 11.3$ ,  $p < 0.0001$ ) explained most of the variance (Table S1, Table S2).

## DISCUSSION

In this study, we evaluated the importance of life-history strategy (LHS) on the freezing-resistance of flowers and leaves in a subalpine community of the central Chilean Andes. In particular, our results showed that perennial species were more freezing-resistant than annual species, considering reproductive and vegetative structures. Besides, in most of the studied species, leaves were more freezing resistant than flowers, indicating that the higher freezing resistance of leaves compared to flowers is independent of the LHS, and could be a common feature in alpine plants. To the best of our knowledge, this study represents the first report that simultaneously determines the freezing resistance of reproductive and vegetative structures in herbaceous species, including the highest number of annual-alpine species reported to date.

**Perennial species are more freezing resistant than annual species**

As we expected LHS has a significant effect on the freezing resistance, where perennial species were more freezing resistant, in flowers and leaves, than annual species. As we stated in our hypothesis argumentation, this pattern could be explained by trade-off between growth rates and freezing resistance (Sakai and Larcher 1987; Neuner and Beikircher 2010; Wringler 2015; Bucher et al. 2019). By definition, annual plant reproduction is sexual and occurs once (Bazzaz and Morse 1991). To assure reproductive success, annual plants have a high growth rate in the pre-reproductive phase and invest most of their energetic and mineral resources into reproduction (Bazzaz et al. 1987; Hancock and Pritts 1987; Garnier 1992). Resource availability is finite; consequently, the high-resource demands for rapid growth and reproduction could produce a trade-off with other functions, in this case, with freezing resistance. The resource allocation trade-offs between growth and freezing resistance have been described in leaves (Neuner and Beikircher 2010; Wringler 2015; Bucher et al. 2019). For example, Neuner and Beikircher (2010) found that when *Picea abies*' leaves were elongating, the onset of the mesophyll cell wall thickening coincided with the lowest freezing resistance, suggesting that the ongoing metabolic and cytological changes leave little leeway for frost hardening in cells during elongation growth. Although this trade-off has not yet been assessed in reproductive structures, this suggests that it could also be occurring and could be even more severe given the high costs of production and maintenance of flowers, and their low contribution to the energetic balance at the whole-plant level, which would explain its lower freezing resistance both in perennial species but especially in annual species. On the other hand, perennial plants allocate more resources to vegetative tissues and reserve organs. They have a longer growth period than

annual plants (Bazzaz et al. 1987; Arroyo et al. 1981). For example, a perennial's transition development phase is longer than that of annual plants, due to a lower relative growth rate (Garnier 1992). This implies that during their lifespan perennial herbs perform more photosynthesis and are highly productive; it also implies that they use their resources conservatively. This conservative use of resources allows them to store non-structural carbohydrates for perennial growth, as well as allowing them to respond to resource imbalances provoked by environmental stresses (Bazzaz and Morse 1991). Given the above, perennial species avoid or diminished the trade-off between growth and freezing resistance, which could be the main explanation for the higher freezing resistance in flowers and leaves compared to those of annual plants.



On one hand, these results suggest that perennial species invest in highly effective freezing protection mechanisms to cope with summer frosts. On the other hand, it reflects the fact that, since the tissues of annual species tend to be more sensitive to freezing temperatures (especially in flowers), the avoidance mechanisms that hinder and/or prevent the formation of ice should have a more significant role in the protection of these tissues against frost damage. Whether the freezing resistance is a response to the type of the underlying mechanism or is related to temporal or spatial escape/avoidance strategies is still uncertain. Therefore, it should be considered for future research.

**Leaves were more freezing resistant than flowers regardless of LHS**

Overall, our results showed that leaves were more freezing resistant than flowers (56% of annual and 42% of perennial studied species, respectively), coinciding with previous reports for Austrian alpine species (Neuner et al. 2013; Ladinig et al. 2013), and subalpine species from the Rocky Mountains (CaraDonna and Bain 2016). Arguments explaining a lower frost resistance in flowers compared to leaves seem to be related to the resource-use efficiency of plants. Provided that the lifespan of most plants' reproductive structures is shorter than that of their vegetative structures, their time exposure to potential stressors during the growing season is therefore also shorter. For example, the flower longevity of herbaceous species from the Rocky Mountains is expected not to exceed 21 days (Ashman and Schoen 1994). In the central Chilean Andes, flower longevity is even shorter, varying from 4 to 9 days at 2320 m and 3550 m, respectively (Arroyo et al. 1981; Arroyo et al. 2013; Pacheco et al. 2016). In contrast, leaf lifespan in herbs from the tropical Andes at elevations between 4000 and 4600 m was on average 193 days (Diemer 1998), at least 90% more than flowers' lifespan. At the same time, the beginning of flowering is a highly-regulated process, where environmental signals for flowering (temperature and photoperiod, Amasino and Michaels 2010) allow plants to avoid conditions that are detrimental to reproduction.

Likewise, it is important to consider that a flower's maintenance is expensive as a sink organ (e.g. carbon metabolism, transpiration, pigment, and nectar production; Ashman and Schoen 1997; Stead et al. 2008) compared with leaves, which also act as a source of resources. In this sense, a trade-off involving resource allocation to flower building/maintenance and flower protection against freezing stress could be



assumed. Thus, allocating resources to develop physiological mechanisms to protect flower structures from freezing damage becomes very expensive in a system where resources are limited and time to complete reproduction is short. This does not mean that reproductive structures are not able to cope with freezing temperatures. Indeed, the mean freezing resistance for high-Andean species' flowers was c.  $-11^{\circ}\text{C}$  (Fig. 3), which is below the magnitude of frost events that frequently occur in the central Chilean Andes during the growing season (Sierra-Almeida et al. 2009; Sierra-Almeida and Cavieres 2012; Sierra-Almeida et al. 2016), offering a margin of safety for most of the studied species. These species most likely cope with summer frost events in their reproductive structures through freezing avoidance/escape strategies, related to spatial and/or temporal exclusion (e.g. plant architecture, structure and anatomy; Larcher 2003).

In this regard, in our study, the type of inflorescence significantly affects the degree of freezing resistance of the flowers ( $p < 0.0001$ ; Table S2), where flowers arranged in a capitulum showed a greater degree of freezing resistance (except for *Madia sativa*) compared to solitary or erect inflorescences. Great freezing resistance of capitula could be the result of the temporal and/or spatial exclusion of ice formation through the arrangement of flowers, where small and numerous flowers are spatially distributed in a disk-like flowerhead. A compressed arrangement of flowers can buffer the daily temperature fluctuation, maintaining steady temperatures inside the inflorescence, and consequently retarding flower frost damage (LV Morales, UDEC, Concepción, Chile, unpubl. res). Capitulum inflorescence is present in plants of the *Chaetanthera* genus (Asteraceae, annual plants), where the freezing resistance of

inflorescences ranged from  $-13^{\circ}\text{C}$  (*C. flabellata*) to below  $-20^{\circ}\text{C}$  (*C. linearis*). For the perennial herb, *Perezia carthamoides*, its capitulum was the most freezing resistant ( $-17.7 \pm 1.3^{\circ}\text{C}$ ; Table 3).

It is important to highlight that the timing of flowering is also one of the factors that determines freezing resistance of flowers ( $R^2: 0.29$ ,  $F_{(3,111)} = 32.4$ ,  $p < 0.0001$ . Table S3). For example, *Barneoudia chilensis* and *Olsynium junceum*, the first species to bloom at 2300 m, showed high values of flower freezing resistance ( $-11.3^{\circ}\text{C}$  and  $-19.9^{\circ}\text{C}$ , respectively), similar to *Draba gilliesii* and *Ipheion sessile* ( $-19.0^{\circ}\text{C}$  and  $-11.8^{\circ}\text{C}$ , respectively), the first species to blooming at 2800 m. High values of freezing resistance in early flowering plants have also been reported by CaraDonna and Bain (2018) and could be a strategy to decrease the probability of being damaged by a frost event (Lenz et al. 2013), which occur more frequently at the beginning of the growing season (Inouye 2008). The high degree of freezing resistance in flowers may be a response to the temperature that flowers have experienced during their development, since cold conditions may decrease flower vulnerability to frost (Proebsting and Mills 1978; Anderson and Seeley 1993; Lu and Rieger 1993; Rodrigo 2000).

Interestingly, 22% and 33% of the annual and perennial studies species' flowers proved to be more resistant to freezing temperatures than their leaves, and in 22% and 24% of the annual and perennial species flowers and leaves resisted similar freezing temperatures (Table 3). The presence of alternative patterns of freezing resistance differences between reproductive and vegetative structures suggests a

complex and integrated combination of life-history traits that could be determining the ability of these alpine species to resist freezing temperatures. In this respect, further studies should include additional life-history traits at the whole plant level that represent the available internal resource pool. Additionally, the timing of the biological process and microhabitat preferences of each species should be considered further, in order to try to understand how often the different tissues face freezing temperatures and thus, how important it is for them to have freezing resistance.

In summary, we found a close relationship between LHS and the freezing resistance, where perennial species were more freezing resistant in flowers and leaves than annual species. This finding suggests that the freezing resistance could be an important functional trait to explain the altitudinal distribution of herbaceous species, since annual species that were found to be more frost-sensitive tended to have a more limited altitudinal distribution, inhabiting and being more abundant at low elevations. Additionally, and confirming previous reports, we found that the most common pattern was that flowers were more sensitive to freezing damage than leaves (particularly in annuals, where 58% of the species shows this pattern). In this sense, annual plants in high-mountain habitats can be particularly sensitive to changes in frost regimes as a consequence of climate change. Therefore, it is crucial to develop monitoring plans in the central Chilean Andes, to protect this unique habitat that houses a particularly large number of annual species that survive and are successful in an environment dominated by perennial plants.

**Acknowledgments** We thank Omar, Octavia, and Bárbara for their help in the fieldwork, Alicia Marticorena and MAK Mihöc for plant identifications, and Daniel Harris-Pascal for English edition of the manuscript.

**Author contributions** LVM and AS-A conceived and designed the research; LVM, CAC and CS carried out the collection and data analysis. LVM interpreted the results and wrote the manuscript with support from AS-A and AS.

**Funding** This work was supported by The National Commission for Science and Technology (CONICYT) through the National Fund for Scientific and Technological Development (FONDECYT 11150710 (AS-A) and FONDECYT 1181688 (AS), and Doctoral Fellowship CONICYT 21151063 (LVM)



**Compliance with ethical standards**

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** This study does not involve research on human participants or animals.

**Informed consent** Informed consent was obtained from all individual participants included in the study

## REFERENCES

- Amasino RM, Michaels SD (2010) The timing of flowering. *Plant Physiol* 154: 516–520
- Anderson JL, Seeley SD (1993) Bloom delay in deciduous fruits. *Hortic Rev* 15: 97–144
- Arias NS, Bucci SJ, Scholz FG, Goldstein G (2015). Freezing avoidance by supercooling in *Olea europaea* cultivars: the role of apoplastic water, solute content and cell wall rigidity. *Plant Cell Environ* 38: 2061–2070
- Arroyo MTK, Armesto JJ, Villagrán C (1981) Plant phenological patterns in the high Andean Cordillera of central Chile. *J Ecol* 69: 205–223
- Arroyo MTK, Dudley LS, Jespersen G, Pacheco DA, Cavieres LA (2013) Temperature-driven flower longevity in a high-alpine species of *Oxalis* influences reproductive assurance. *New Phytol* 200: 1260–1268
- Ashman TL, Schoen DJ (1994) How long should flowers live? *Nature* 371: 788–791
- Augspurger CK (2009) Spring 2007 warmth and frost: phenology, damage and refoliation in a temperate deciduous forest. *Funct Ecol* 23: 1031–1039
- Bannister P (2005) Frost resistance of the New Zealand narrow-leaved snow tussock grass, *Chionochloa rigida*. *N.Z. J. Bot.* 43: 425–430
- Bazzaz FA, Chiariello NR, Coley PD, Pitelka LF. 1987. Allocating resources to reproduction and defense. *BioScience* 37: 58–67
- Bazzaz FA, Morse FBS (1991) Annual plants: potential responses to multiple stresses. In: Mooney HA, Winner WE, Pell EJ (ed) *Response of plants to multiple stresses*. Academic Press, San Diego, pp 283–305
- Billings WD (1974). Arctic and alpine vegetation: plant adaptations to cold summer climates. In: J.D. Ives and R.G. Barry (Ed) *Arctic and Alpine Environments*. Methuen, London, 403–443
- Billings WD, Mooney HA (1968) The ecology of arctic and alpine plants. *Biol Rev* 43: 481–529
- Bokhorst S, Bjerke JW, Bowles FW, Melillo J, Callaghan TV, Phoenix GK (2008) Impacts of extreme winter warming in the sub-Arctic: growing season responses of dwarf shrub heathland. *Glob Chang Biol* 14: 2603–2612
- Bucher SF, Feiler R, Buchner O, Neuner G, Rosbakh S, Leiterer M, Römermann C (2019) Temporal and spatial trade-offs between resistance and performance traits in herbaceous plant species. *Environ Exp Bot* 157: 187–196
- CaraDonna PJ, Bain JA (2016) Frost sensitivity of leaves and flowers of subalpine plants is related to tissue type and phenology. *J Ecol* 104: 55–64

- Cavieres LA, Peñaloza A, Arroyo MTK (2000) Altitudinal vegetation belts in the high-Andes of Central Chile (33°S). *Rev. Chil. Hist. Nat.* 73: 331–344
- Cavieres LA, Badano E, Sierra-Almeida A, Gómez-González S, Molina-Montenegro MA (2006) Positive interactions between alpine plant species and the nurse cushion plant *Laretia acaulis* do not increase with elevation in the Andes of central Chile. *New Phytol* 169: 59–69
- Cavieres LA, Badano E, Sierra-Almeida A, Molina-Montenegro MA (2007) Microclimatic modifications of cushion plants and their consequences for seedling survival of native and non-native herbaceous species in the high Andes of central Chile. *Arct. Antarct. Alp. Res.* 39: 229–236
- Chabot BF, Billings WD (1972) Origins and ecology of the Sierran alpine flora and vegetation. *Ecol Monogr* 42: 163–199
- Díaz S, Hodgson JG, Thompson K et al (2004) The plant traits that drive ecosystems: evidence from three continents. *J Veg Sci* 15: 295–304
- Diemer M (1998) Life span and dynamics of leaves of herbaceous perennials in high-elevation environments: 'news from the elephant's leg'. *Funct Ecol* 12: 413–425
- Dumlao MR, Darehshouri A, Cohu CM, Muller O, Mathias J, Adams III WW, Demmig-Adams B (2012) Low temperature acclimation of photosynthetic capacity and leaf morphology in the context of phloem loading type. *Photosyn. Res* 113: 81–189
- Garnier E (1992) Growth analysis of congeneric annual and perennial grass species. *J Ecol* 80: 665–675
- Gerdol R, Siffi C, Iacumin P, Gualmini M, Tomaselli M (2013) Advanced snowmelt affects vegetative growth and sexual reproduction of *Vaccinium myrtillus* in a sub-alpine heath. *J. Veg. Sci.* 24: 569–579
- Hacker J, Ladinig U, Wagner J, Neuner G (2011) Inflorescences of alpine cushion plants freeze autonomously and may survive subzero temperatures by supercooling. *Plant Sci* 180: 149-156
- Hancock JF, Pritts MP (1987) Does reproductive effort vary across different life forms and seral environments? A review of the literature. *Bull Torrey Bot Club* 114: 53–59
- Hoffmann A, Arroyo MTK, Liberona F, Muñoz M, Watson J (1998) *Plantas Altoandinas en la Flora Silvestre de Chile*. Ediciones Fundación Claudio Gay, Santiago, Chile
- Inouye DW (2000) The ecological and evolutionary significance of frost in the context of climate change. *Ecol Lett* 3: 457–463
- Inouye DW (2008) Effects of climate change on phenology, frost damage, and floral abundance of montane wildflowers. *Ecology* 89: 353–362

- Körner C, Renhardt U (1987) Dry matter partitioning and root length/leaf area ratios in herbaceous perennial plants with diverse altitudinal distribution. *Oecologia* 74: 411–418
- Körner C (2003) *Alpine plant life: functional plant ecology of high mountain ecosystems*; with 47 tables, 2nd edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Berlin
- Körner C, Alsos IG (2009) Freezing resistance in high arctic plant species of Svalbard in mid-summer. *Bauhinia* 21: 25–32.
- Ladinig U, Hacker J, Neuner G, Wagner J (2013) How endangered is sexual reproduction of high-mountain plants by summer frosts? Frost resistance, frequency of frost events and risk assessment. *Oecologia* 171: 743–760
- Larcher W (2003) *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer Science and Business Media
- Larcher W, Kainmüller C, Wagner J (2010) Survival types of high mountain plants under extreme temperatures. *Flora* 205: 3–18
- Lenz A, Hoch G, Vitasse Y, Körner C (2013) European deciduous trees exhibit similar safety margins against damage by spring freeze events along elevational gradients. *New Phytol* 200: 1166–1175
- Lipp CC, Goldstein G, Meinzer FC, Niemczura W (1994) Freezing tolerance and avoidance in high-elevation Hawaiian plants. *Plant Cell Environ* 17: 1035–1044
- Loik ME, Still C, Huxman T, Harte J (2004) In situ photosynthetic freezing tolerance for plants exposed to a global warming manipulation in the Rocky Mountains, Colorado, USA. *New Phytol* 162: 331–341
- Lu S, Rieger M (1993) Effect of temperature preconditioning on ovary freezing tolerance of fully opened peach flowers. *J Hortic Sci* 68: 343–347
- Neuner G, Beikircher B (2010) Critically reduced frost resistance of *Picea abies* during sprouting could be linked to cytological changes. *Protoplasma* 243: 145–152
- Neuner G, Eler A, Ladinig U, Hacker J, Wagner J (2013) Frost resistance of reproductive tissues during various stages of development in high mountain plants. *Physiol Plant* 147: 88–100
- Pacheco DA, Dudley LS, Cabezas J, Cavieres LA, Arroyo MTK (2016) Plastic responses contribute to explaining altitudinal and temporal variation in potential flower longevity in high Andean *Rhododendron montanum*. *PloS One*, 11: e0166350. <http://doi:10.1371/journal.pone.0166350>
- Pescador DS, Sierra-Almeida A, Torres PJ, Escudero A (2016) Summer freezing resistance: a critical filter for plant community assemblies in Mediterranean High-mountains. *Front Plant Sci* 7:197. [http://doi: 10.3389/fpls.2016.00194](http://doi:10.3389/fpls.2016.00194)
- Proebsting EL, Mills HH (1978) A synoptic analysis of peach and cherry bud hardiness. *J Am Soc Hortic Sci* 103: 842–845



- Reich PB (2014) The world-wide 'fast-slow' plant economics spectrum: a traits manifesto. *J Ecol* 102: 275–301
- Rixen C, Dawes MA, Wipf S, Hagedorn F (2012) Evidence of enhanced freezing damage in treeline plants during six years of CO<sub>2</sub> enrichment and soil warming. *Oikos* 121: 1532–1543
- Rodrigo J (2000) Spring frosts in deciduous fruit trees — morphological damage and flower hardiness. *Sci Hortic* 85: 155–173
- Rodríguez R, Marticorena C†, Alarcón D, et al. 2018. Catalogue of the vascular plants of Chile. *Gayana Bot* 75: 1– 430
- Sakai A, Otsuka K (1970). Freezing resistance of alpine plants. *Ecology* 51: 665–671
- Sakai A, Larcher W (1987) Frost survival of plants: responses and adaptation to freezing stress. Springer-Verlag, Berlin, Germany
- Santibañez F, Uribe J (1990) Atlas Agroclimático de Chile. Regiones V y Metropolitana. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Santiago
- Sierra-Almeida A, Cavieres LA, Bravo LA (2009) Freezing resistance varies within the growing season and with the elevation in high-Andean species of central Chile. *New Phytol* 182: 461–469
- Sierra-Almeida A, Cavieres LA, Bravo LA (2010) Freezing resistance of high elevation plant species is not related to their height or growth-form in the central Chilean Andes. *Environ Exp Bot* 69:273–278
- Sierra-Almeida A, Cavieres LA (2012) Summer freezing resistance of high-elevation plant species changes with ontogeny. *Environ Exp Bot* 80:10–15
- Sierra-Almeida A, Reyes-Bahamonde C, Cavieres LA (2016) Drought increases the freezing resistance of high-elevation plants of the central Chilean Andes. *Oecologia* 181: 1011–1023
- Sklenář P, Kucerova A, Macek P, Mackova J (2010) Does plant height determine the freezing resistance in the páramo plants? *Austral Ecol* 35: 929–934
- Squeo FA, Rada F, García C, Ponce M, Rojas A, Azócar A (1996) Cold resistance mechanisms in high desert Andean plants. *Oecologia* 105: 552–555
- Stead AD, Van Doorn WG, Jones ML, Wagstaff C (2008) Flower senescence: fundamental and applied aspects. In: Ainsworth C, eds. *Annual Plant Reviews, Flowering and its Manipulation*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp 261–296
- Taschler D and Neuner G (2004) Summer frost resistance and freezing patterns measured in situ in leaves of major alpine plant growth forms in relation to their upper distribution boundary. *Plant Cell Environ* 27: 737–746



Teillier S, Marticorena A, Niemeyer HM (2011) Flora Altoandina de Santiago. Guía para la identificación de las especies de las cuencas del Maipo y del Mapocho. Universidad de Chile, Santiago.

Torres-Díaz C, Gómez-González S, Stotz GC, Torres-Morales P, Paredes B, Pérez-Millaqueo M, Gianoli E (2011) Extremely long-lived stigmas allow extended cross-pollination opportunities in a High Andean plant. PLoS One 6: e19497. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0019497>

Venn SE, Morgan JW, Lord JM (2013) Foliar freezing resistance of Australian alpine plants over the growing season. Austral Ecol 38: 152–161

Vitasse Y, Lenz A, Körner C (2014) The interaction between freezing tolerance and phenology in temperate deciduous trees. Frontiers in Plant Science 5: 541. <http://doi.org/10.3389/fpls.2014.00541>

Wilner J (1960) Relative and absolute electrolytic conductance tests for frost hardiness of apple varieties. Can J Plant Sci 40: 630–637

Wingler A (2015) Comparison of signalling interactions determining annual and perennial plant growth in response to low temperature. Front Plant Sci 5:794. <http://doi: 10.3389/fpls.2014.00794>

Woodward FI (1987) Climate and plant distribution. Cambridge University Press, Cambridge

Wright IJ, Reich PB, Westoby M, et al (2004) The worldwide leaf economics spectrum. Nature 428: 821–827

Zhang YJ, Bucci SJ, Arias NS, Scholz FG, Hao GY, Cao KF, Goldstein, G (2016) Freezing resistance in Patagonian woody shrubs: the role of cell wall elasticity and stem vessel size. Tree Physiol 36: 1007–1018

**Table 1.** General characteristics of the frost events that have occurred during the growing season in the central Chilean Andes.

Elevation	Growing season	Daily mean temperature (°C) ± SE	Daily mean minimum temperature (°C) ± SE	Daily mean maximum temperature (°C) ± SE	Number of frosts events	Frost intensity (°C) ± SE	Frost Duration (h below 0°C) ± SE	Absolute minimum temperature (°C)	Date of Min. Temperature (day/month/year)
<b>2200m</b>	2017-2018	17.7 ± 0.2	6.4 ± 0.3	35.6 ± 0.9	2	-0.4 ± 0.4	1	-0.9	21-11-17
	2009-2010	5.9 ± 0.4	2.6 ± 0.5	9.7 ± 0.4	59	-1.7 ± 0.2	11.9 ± 2.0	-12.1	05-09-09
<b>2800m</b>	2011-2012	7.9 ± 0.3	4.7 ± 0.3	11.3 ± 0.3	26	-1.4 ± 0.3	14.2 ± 4.4	-10.7	06-09-11
	2013-2014	8.3 ± 0.3	5.8 ± 0.3	12.0 ± 0.3	13	-0.9 ± 0.2	6.2 ± 1.9	-4.6	10-11-13
	2014-2015	9.6 ± 0.3	6.6 ± 0.3	12.8 ± 0.3	7	-1.2 ± 0.4	13 ± 5.9	-5.3	29-11-14
	2017-2018	13.5 ± 0.2	3.4 ± 0.2	28.7 ± 0.7	27	-1.5 ± 0.1	4.4 ± 0.6	-5.3	16-11-17

\*Air temperature data were recorded every 1 h at weather stations (HOBO micro station, Onset Computer Corporation) located 1.5 m above the ground. For the growing season 2017-2018 data were recorded with a Temperature/Relative Humidity Data Logger (HOBO Pro v2.6 Ext., Onset Computer Corporation) located 50 cm above the ground. Standard error (SE) in all cases is standard error of the mean.

**Table 2.** Taxonomic, morphological and geographical information for 22 herbaceous species from the central Chilean Andes included in the freezing resistance determinations.

Species	Family	Growth form	Leaf type	Flower type	Date of collection	Altitudinal distribution in the area (masl)
<b>Annual species</b>						
<i>Chaetanthera flabellata</i>	Asteraceae	Rosette	Simple lanceolate	Inflorescence capitulum	Dec.17	2200-3500
<i>Chaetanthera linearis</i>	Asteraceae	Forb	Simple Linear	Inflorescence capitulum	Dec.28	NA-2200
<i>Collomia biflora</i>	Polemoniaceae	Forb	Simple ovate	Terminal inflorescence	Nov.17	2100-2400
<i>Lupinus microcarpus</i>	Fabaceae	Forb	Compound	Solitary flower (a group of 6)	Nov.17	2100-2500
<i>Madia sativa</i>	Asteraceae	Forb	Simple lanceolate	Inflorescence capitulum	Dec.28	2300-2500
<i>Microsteris gracilis</i>	Polemoniaceae	Forb	Simple lanceolate	Solitary flower	Oct.17	2100-3100
<i>Phacelia brachyantha</i>	Boraginaceae	Forb	Simple elliptical	Terminal inflorescence	Nov.17	1800-2200
<i>Quinchamalium parviflorum</i>	Schoepfiaceae	Forb	Simple linear-fleshy	Spherical inflorescence	Dec.28	2300-2800
<i>Schizanthus hookeri</i>	Solanaceae	Forb	Simple pinnatisecta	Inflorescence cyme	Dec.28	1800-2300
<i>Scyphanthus elegans</i>	Loasaceae	Forb	Simple pinnatisecta	Inflorescence cyme	Dec.28	1800-2300
<b>Perennial Species</b>						
<i>Acaena splendens</i>	Rosaceae	Forb	Compound	Inflorescence like-spikes	Nov.17	2100-2400
<i>Alstroemeria exerens</i>	Alstroemeriaceae	Forb	Simple ovate-elliptic	Small umbels	Jan.29	2300-2700
<i>Barneoudia chilensis</i>	Ranunculaceae	Rosette	Simple obovate	Solitary flower	Oct.17	2320-2700

<i>Draba gilliesii</i>	Brassicaceae	Forb	Simple oblong	Inflorescence corymbs	Nov.17	2700-3550
<i>Hordeum comosum</i>	Poaceae	Grass	Simple linear	Spike inflorescence	Jan.29	1900-3800
<i>Ipheion sessile</i>	Amaryllidaceae	Forb	Simple linear	Umbel inflorescence	Nov.17	NA-2700
<i>Olsynium junceum</i>	Iridaceae	Forb	Simple cylindrical	Solitary flower	Oct.17	2500-3500
<i>Oxalis cinerea</i>	Oxalidaceae	Forb	Compound	Terminal inflorescence	Oct.17	2100-2900
<i>Perezia carthamoides</i>	Asteraceae	Forb	Simple linear	Inflorescence capitulum	Jan.29	1800-2100
<i>Poa holciformis</i>	Poaceae	Grass	Simple linear	Spike inflorescence	Oct.17	2300-3300
<i>Sanicula graveolens</i>	Apiaceae	Forb	Compound	Umbel inflorescence	Nov.17	2300-2900
<i>Stachys philippiana</i>	Lamiaceae	Forb	Simple oblong	Solitary flower	Nov.17	1800-2300

\*Altitudinal distribution and morphological traits according to Teillier et al. 2011; Cavieres et al. 2000; Hoffmann et al. 1998 and personal observations. Plant nomenclature follows Rodríguez et al. 2018.



**Table 3.** Freezing resistance of leaves and flowers measured during the growing season in 10 annual and 12 perennial herb species from the Andes of central Chile. LT<sub>50</sub> are shown as mean ± standard error. Thermal differences are shown as level of significance: \*p <0.05; \*\*p <0.01; \*\*\*p <0.001; and ns, not significant. Trend: L>F: leaves (L) had greater freezing resistance than flowers (F), L=F: there were no differences and L<F: flowers had greater freezing resistance than leaves.

Species	Leaf freezing resistance LT <sub>50</sub> (°C)	Flower freezing resistance LT <sub>50</sub> (°C)	Thermal difference	Trend
<b>Annuals Herbs</b>				
<i>Chaetanthera flabellata</i>	-20.0 ± 0.0	-12.9 ± 0.2	7.1**	L>F
<i>Chaetanthera linearis</i>	-20.0 ± 0.0	-20.0 ± 0.0	0.0	ND
<i>Collomia biflora</i>	-6.6 ± 0.5	-9.1 ± 0.9	2.5*	L<F
<i>Lupinus microcarpus</i>	-20.0 ± 0.0	-9.9 ± 0.9	10.1**	L>F
<i>Madia sativa</i>	-9.3 ± 1.1	-6.4 ± 0.4	2.9*	L>F
<i>Microsteris gracilis</i>	-8.2 ± 0.6	-17.9 ± 0.3	9.8**	L<F
<i>Phacelia brachyantha</i>	-8.1 ± 0.4	-5.5 ± 0.4	2.6***	L>F
<i>Quinchamalium parviflorum</i>	-11.8 ± 0.4	-7.4 ± 0.6	4.4**	L>F
<i>Schizanthus hookeri</i>	-7.5 ± 0.8	-7.5 ± 0.6	0.1 <sup>ns</sup>	L=F
<i>Scyphanthus elegans</i>	-7.0 ± 0.6	-6.5 ± 0.2	0.5 <sup>ns</sup>	L=F
<b>Perennial Herbs</b>				
<i>Acaena splendens</i>	-20.0 ± 0.0	-14.4 ± 1.1	5.6**	L>F
<i>Alstroemeria exerens</i>	-10.9 ± 1.0	-6.2 ± 0.4	4.6**	L>F
<i>Barneoudia chilensis</i>	-7.8 ± 0.4	-11.3 ± 1.9	3.4 <sup>ns</sup>	L=F
<i>Draba gilliesii</i>	-12.7 ± 0.8	-19.0 ± 0.9	6.3*	L<F
<i>Hordeum comosum</i>	-11.5 ± 0.8	-14.3 ± 0.1	2.9*	L<F
<i>Ipheion sessile</i>	-12.7 ± 1.1	-11.8 ± 0.9	0.9 <sup>ns</sup>	L=F

<i>Olsynium junceum</i>	-15.5 ± 0.9	-19.9 ± 0.1	4.4**	L<F
<i>Oxalis cinerea</i>	-16.2 ± 1.6	-9.0 ± 0.8	7.2**	L>F
<i>Perezia carthamoides</i>	-12.5 ± 0.8	-17.7 ± 1.3	5.2**	L<F
<i>Poa holciformis</i>	-7.3 ± 0.3	-8.9 ± 0.8	1.6 <sup>ns</sup>	L=F
<i>Sanicula graveolens</i>	-16.3 ± 1.2	-6.8 ± 0.3	9.5***	L>F
<i>Stachys philippiana</i>	-10.5 ± 0.4	-8.5 ± 0.8	2.1***	L>F

---



## Figures legends

**Fig. 1** Summer freezing resistance ( $LT_{50}$ ) measured in the flowers and leaves of 10 annual and 12 perennial herbs species. Boxes indicate the median (= second quartile; line inside the box) and extend from the first to the third quartile. The whiskers show at maximum the 1.5-fold interquartile range. Black circles represent mean values. Different superscripts indicate significant differences in  $LT_{50}$  between organs ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 2** Summer freezing resistance ( $LT_{50}$ ) measured in the flowers (pink) and leaves (green) of 10 annual and 12 perennial herbs species. Black circles represent mean values and the whiskers show the standard error.

**Fig. 3** Summer freezing resistance ( $LT_{50}$ ) measured in the flowers and leaves of 22 alpine species. Boxes indicate the median (= second quartile; line inside the box) and extend from the first to the third quartile. The whiskers show at maximum the 1.5-fold interquartile range. Black circles represent mean values. Different superscripts indicate significant differences in  $LT_{50}$  between organs ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 1**

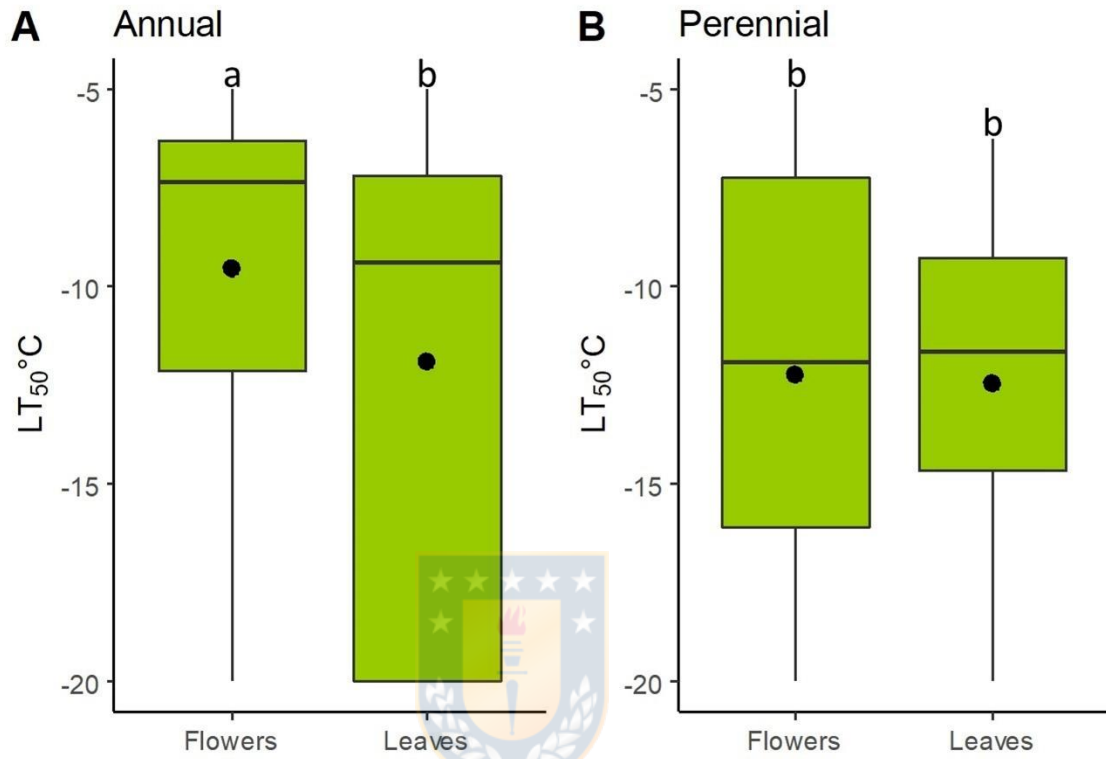




Fig. 2

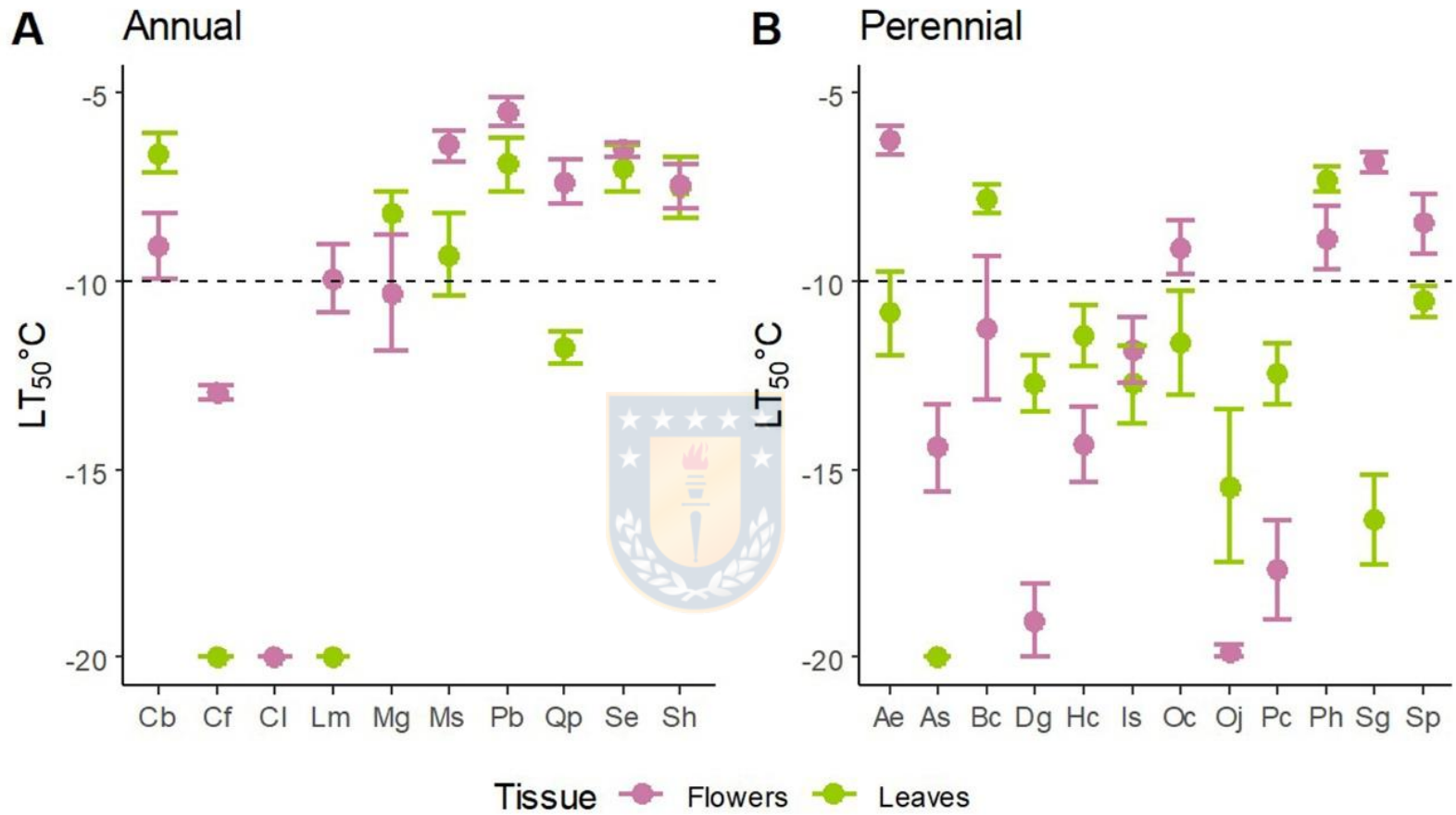
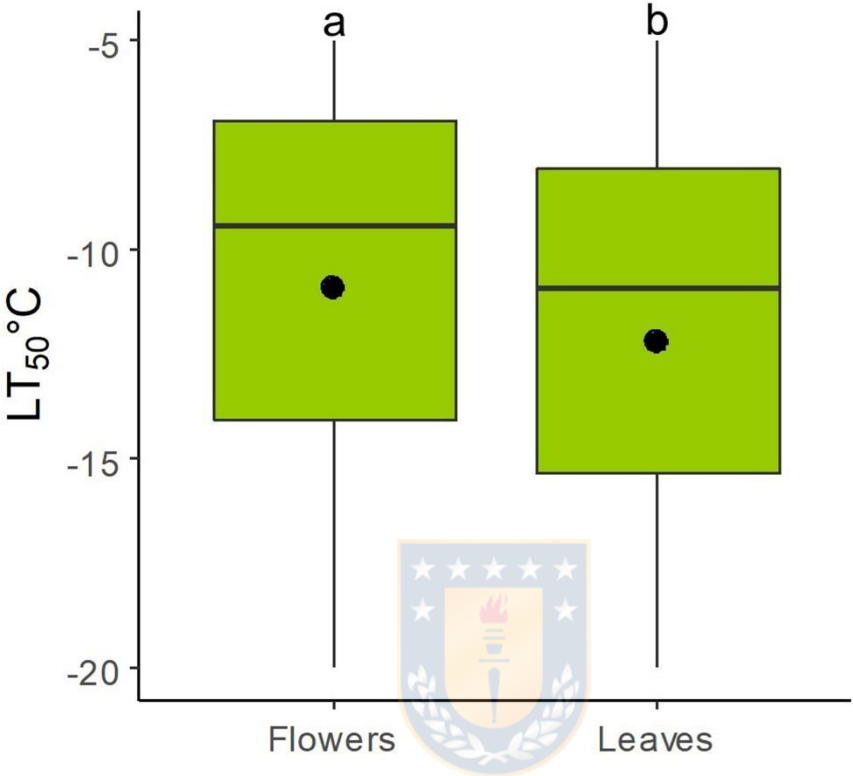


Fig. 3



**Supplemental Information for “Does the life-history strategy determine the freezing resistance of flowers and leaves of alpine herbaceous species?”**

**Loreto V. Morales\*1, Carla Alvear1, Camila Sanfuentes2,3, Alfredo Saldaña1 and Ángela Sierra-Almeida1**

**Manuscrito publicado en Alpine Botany:**

Morales, LV., Alvear, C., Sanfuentes, C. et al. Does the life-history strategy determine the freezing resistance of flowers and leaves of alpine herbaceous species?. *Alp Botany* 130, 157–168 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00035-020-00236-5>

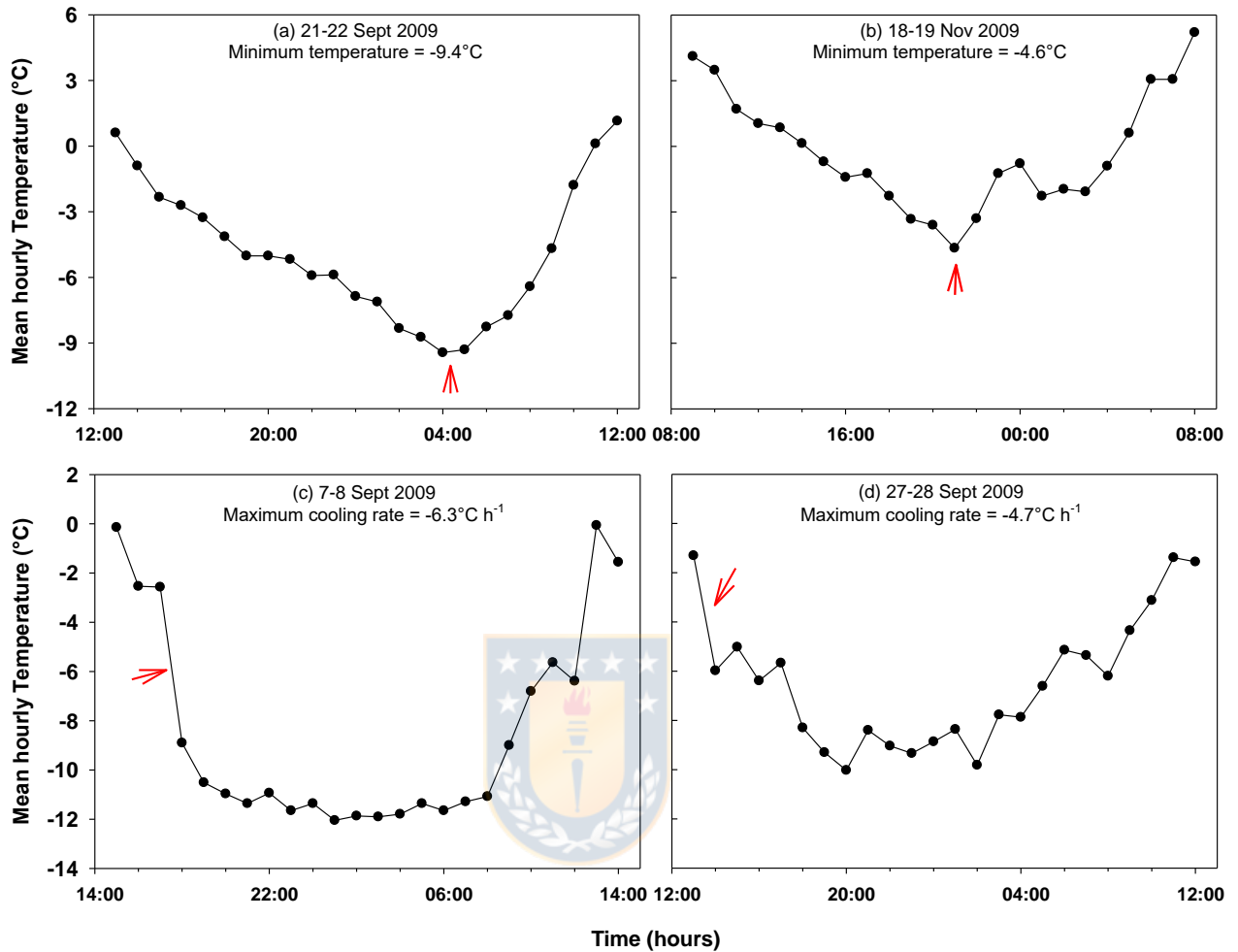


Additional supporting information contains the following:

**Fig S1.** Examples of frost events that occurs during the growing season in the Andes of central Chile..... 2

**Table S1.** Analysis of variance to assess the effect of life-history strategy, flower type, altitudinal distribution, elevation and date of measurement on flowers freezing resistance (LT<sub>50</sub>). Significant p-values are highlighted in bold..... 3

**Table S2.** Analysis of variance to assess the effect of life-history strategy, leaf type, altitudinal distribution, elevation and date of measurement on leaves freezing resistance (LT<sub>50</sub>). Significant p-values are highlighted in bold..... 4



**Fig. S1** (a–b) Examples of frost events that occurs during the growing season in the Andes of central Chile. (c-d) Examples of extreme frost events when the cooling rate reach values close to  $-5^{\circ}\text{C h}^{-1}$ . Hourly air temperature data were recorded at weather stations (HOBO micro station, Onset Computer Corporation) located 1.5 meters above the ground. The red arrows indicate the minimum temperature (a-b) and the maximum cooling rate (c-d) of every frost event.

**Table S1.** Analysis of variance to assess the effect of life-history strategy, flower type, altitudinal distribution, elevation and date of measurement on flowers freezing resistance (LT<sub>50</sub>).

Significant p-values are highlighted in bold.

<b>Effect</b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>p-value</b>
Life-history Strategy	1	0.050	0.050	38.572	<b>9.4e-09</b>
Flower type	5	0.044	0.009	6.873	<b>1.3e-05</b>
Altitudinal distribution	1	0.061	0.061	47.554	<b>3.4e-10</b>
Elevation	1	0.002	0.002	1.840	0.1777
Date	3	0.125	0.042	32.386	<b>4.1e-15</b>
Residuals	111	0.143	0.001		



**Table S2.** Analysis of variance to assess the effect of life-history strategy, leaf type, altitudinal distribution, elevation and date of measurement on leaves freezing resistance (LT<sub>50</sub>). Significant p-values are highlighted in bold.

Effect	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	p-value
Life-history Strategy	1	0.058	0.058	15.377	<b>1.7e-04</b>
Leaf type	5	0.769	0.154	40.895	<b>&lt; 2.2e-16</b>
Altitudinal distribution	1	0.005	0.005	1.212	0.274
Elevation	1	0.088	0.088	23.431	<b>5.1e-06</b>
Date	3	0.127	0.042	11.249	<b>2.3e-06</b>
Residuals	93	0.350	0.004		



## **CAPÍTULO II**

### **Annual and perennial high-Andes species have a contrasting freezing-resistance mechanism to cope with summer frosts**

Loreto V. Morales\*1, Carla Alvear1, Camila Sanfuentes2,3, Alfredo Saldaña1 and Ángela Sierra-Almeida\*1

#### **Manuscrito publicado en Alpine Botany:**

Morales, L.V., Alvear, C., Sanfuentes, C. et al. Annual and perennial high-Andes species have a contrasting freezing-resistance mechanism to cope with summer frosts. *Alp Botany* 130, 169–178 (2020). [https://doi.org/10.1007/s00035-020-00239-](https://doi.org/10.1007/s00035-020-00239-2)

2

## ABSTRACT

In high-mountain habitats, summer frosts have negative consequences for plant fitness, therefore high-mountain plants have developed mechanisms of avoidance and tolerance to cope with freezing temperatures. Various hypotheses have been proposed to explain the prevalence of one freezing-resistance mechanism over another, focusing on thermal conditions without a consensus. We hypothesize that the prevalence of a freezing-resistance mechanism depends on the life-history strategy of the species, and is probably the consequence of a trade-off between growth/reproduction and the cost of the mechanism. Specifically, short-lived annual species should be freezing avoidant, whereas perennial long-lived species should be freezing tolerant. We used thermal analysis to determine the mechanism of freezing resistance of leaves and flowers for 10 annual and 14 perennial herb species from an alpine ecosystem in the Central Chilean Andes. We found that 70% of the annual species, their flowers and leaves were freezing avoidant, indicating that avoidance was their predominant freezing-resistance mechanism. In the case of perennial species, both mechanisms were almost equally represented in flowers and leaves. Overall, our results showed that a species freezing-resistance mechanism depends on its life-history strategy, and that leaves and flowers of single species exhibit the same freezing resistance mechanism, suggesting a common whole plant strategy. Further, freezing resistance strategies were not found to be mutually exclusive. In some cases, a specific combination of phenological, structural, and functional strategies may determine how freezing resistant vegetative and reproductive organs are to freezing during the growing season.



**Keywords:** alpine, freezing avoidance, freezing tolerance, growing season, reproduction



## INTRODUCTION

In high mountain habitats, one of the main abiotic factors that determine a plant's distribution is low temperatures (Körner 2003). In these cold habitats, frosts events and the accumulation of snow during the winter restrict the plant's growth and reproduction to the spring and summer months, where the temperatures are more suitable for plant development. However, unpredictable and stochastic frost events during the growing period occur, occasionally exceeding the frost resistance of alpine plants (Taschler and Neuner 2004), causing significant damage and destruction of vegetative and reproductive structures (Inouye 2000; Taschler and Neuner 2004; Augspurger 2009; Ladinig et al. 2013; Lenz et al. 2013; Vitasse et al. 2014; CaraDonna and Bain 2016).

Studies have shown that high-mountain plants have developed physiological mechanisms that allow them to cope with frost events. These physiological mechanisms are categorized into freezing avoidance and freezing tolerance (Levitt 1980). Freezing avoidance is the plant's ability to avoid or delay ice formation in their tissues (e.g. by supercooling, morphological ice barriers, extra-organ freezing). This mechanism has been typically associated with structural traits that determine if, when, and where ice forms and propagates (e.g. small cell size, little intercellular space, thick cuticles; Gusta and Wisniewski 2013). Likewise, freezing tolerance is the plant's ability to survive extracellular ice formation without irreversible damage, and includes biochemical responses

regulated by a specific set of genes that allows plants to tolerate the dehydration stress associated with the presence of ice in their tissues (e.g. changes in membrane composition, production of compatible solutes, protein induction, cryoprotective substances; Uemura and Steponkus 1994; Hughes and Dunn 1996; Strand et al. 2003; Hekneby et al. 2006; Gusta and Wisniewski 2013). Due to avoidance mechanisms are commonly associated with anatomical features, they are considered less expensive in energy terms compared to induced responses. In turn, since avoidance mechanisms prevent ice formation, vital functions and cellular processes are not disrupted, and therefore are favorable for plants during periods of metabolic and developmental activity (Sakai and Larcher 1987). Conversely, there is a compromise between normal cell function and the ability to tolerate extracellular ice. Despite freezing tolerance mechanisms are expensive in terms of resource allocation, they are adequate in coping with lower and long-lasting freezing temperatures compared with freezing avoidance mechanisms which are adequate when slight frosts occurred only for a few hours (Goldstein et al. 1985; Rada et al. 1987).

Some authors have proposed that thermal conditions could explain the prevalence of one freezing resistance mechanism over another at the species level, without finding a consensus. Namely, the freezing resistance mechanism presented by a species could be related to the frequency and intensity of frost events that plants experience (Sakai and Larcher 1987; Larcher 2003). On the one hand, freezing avoidance should be more frequent in species inhabiting sites

where the intensity of the freezing events is moderate (a few degrees below 0 °C) and of short duration. On the other hand, freezing tolerance should be more frequent in locations where freezing events are severe and of long duration (Sakai and Larcher 1987; Larcher 2003). Based on this hypothesis, several authors have proposed that the evolution of freezing avoidance and/or tolerance mechanisms will depend on the microclimatic temperature regimes determined by the plant's height (Azócar et al. 1988, Squeo et al. 1991). Therefore, on a thermal gradient in the air–soil profile, where night-time temperatures near the ground can be much colder than air temperature due to radiative cooling (Körner 2016), selection could favor freezing tolerance in short plants, as rosettes, cushion plants, and grasses (Beck et al. 1982; Azócar et al. 1988; Squeo et al. 1991; Márquez et al. 2006, Sklenář et al. 2010). Conversely, freezing avoidance could be selected in taller plants (e.g. shrubs) experiencing a milder thermal microclimate (Squeo et al. 1991, 1996; Márquez et al. 2006). Evidence that supports this hypothesis is limited and inconclusive: some supporting evidence has been found by Goldstein et al. (1985) and Rada et al. (1985, 1987) who reported that in *Polylepis sericea* and several species of *Espeletia*, which have vegetative buds at more than 1 m above ground, the main mechanism against freezing injury in this tropical environment is freezing avoidance by supercooling. However, other studies have found the opposite pattern. For example, Afroalpine (Beck et al. 1982, 1994) and Hawaiian giant rosettes (Melcher et al. 1994) are freezing tolerant despite their plant heights. Finally, others found no relationship between the freezing

resistance mechanism and the plant height for Chilean (Sierra-Almeida et al. 2010) and Equatorial alpine species (Sklenář et al. 2010).

The above findings suggest that the prevalence of one freezing resistance mechanism over another is determined by a combination of frost regimes and an integrative group of plant traits associated with life-history strategy (LHS). This is because the energetic investment in functions like growth and reproduction, determined by the LHS, could cause plants to have less resources to allocate to other functions like freezing resistance (a survival mechanism; Agrawal et al. 2004; Neuner and Beikircher 2010; Wingler 2015; Bucher et al. 2019). Supporting the above, Morales et al. (2020) found that the degree of freezing resistance in leaves and flowers of herbaceous species of Chilean central Andes depends on the LHS. For these studied species, 58% and 83% of perennial species resist temperatures  $\leq -10$  °C in their flowers and leaves, respectively, compared with only 30% and 40% of annual species. However, whether the freezing resistance is consequence of the underlying mechanism is still uncertain. Based on above, it is to be expected that plants with contrasting LHS should select different freezing-resistance mechanisms according to the energetic cost and budget. For example, in annual species which have a high growth rate in the pre-reproductive phase and invest most of their energetic and mineral resources in reproduction (Bazzaz et al. 1987; Hancock and Pritts 1987; Garnier 1992), it should be expected that freezing avoidance mechanisms are commonly utilized in their organs. Since an avoidance mechanism implies a lower energy cost, annual

plants would avoid or diminished the trade-off with the resource intensive demands of growth and reproduction. Conversely, in perennial plants which have a more conservative use of energy due to a longer growth period and a lower relative growth rate than annual plants (Bazzaz et al. 1987; Bazzaz and Morse 1991; Garnier 1992), it should be expected that freezing tolerance mechanisms are commonly utilized in their organs to increase plants long-term survival.

In this study, we present an alternative explanation that could help to explain the determinants of the freezing resistance mechanism in alpine plant species. We hypothesize that the occurrence of the freezing-resistance mechanism in the high-Andean plants of central Chile depends on their LHS, where short-lived annual herbs should be freezing-avoidant, whereas long-lived perennial herbs should be freezing-tolerant. For this, we determined the freezing-resistance mechanism at the whole-plant level (including reproductive and vegetative organs) of fourteen perennial and ten annual species that live in the Central Chilean Andes. Specifically, we ask if there are differences in the freezing-resistance mechanism between annual and perennial herbs?

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study site and species**

This study was carried out near Farellones (33°17'S 70°25'W), in the central Chilean Andes, 50 km east of Santiago. The climate in this area is alpine with a

strong Mediterranean influence, which predominates at lower elevations, generating a dry growing season (Santibañez and Uribe 1990). This area is characterized by the dominance of shrubs and dwarf shrubs such as *Anarthrophyllum cumingii*, *Chuquiraga oppositifolia* and *Tetraglochin alatum*, perennial herbs such as *Alstroemeria exerens* and *Stachys philippiana*, and annual species such as *Chaetanthera spp*, *Collomia biflora* and *Microsteris gracilis* (lower Andean vegetation belt, Teillier et al. 2011).

The growing season begins with the snowmelt in October and ends in April with the first snowfall (Sierra-Almeida and Cavieres, 2012). During this period, the daily mean air temperature is 15.4° C, with daily maximum and minimum temperatures of 32 and 5°C, respectively (average temperatures between 2200 and 2800 m above sea level; Table S1). Frost events are distributed throughout the growing season, though they are more frequent at the beginning and end of the season (October-November and February-March). There is high inter-annual variation in the number and intensity of frost events, ranging from 2 to 59 frost events per growing season. The duration of these frost events is also highly variable, ranging from 1.5 hours to 13 hours. Minimum temperature can drop below -10°C in spring (Morales et al. 2020).

A total of 24 species was studied, including 10 annual and 14 perennial herbaceous species (Table 1). Plant material for each studied species was collected between 2200 and 2800 m above sea level. The studied species were primarily selected based on their observed abundance in the plant herbaceous

community. Then, we considered the morphological characteristics of reproductive (flowers/inflorescences) and vegetative (leaves) organs, which should be present at the same time, in order to simultaneously determine their freezing resistance. Plant material was collected between 17-Oct-2017 and 01-Jan-2018, according to the phenology of each studied species.

### **Plant sample collection**

Plant samples were collected from randomly selected plant individuals (n = 7 individuals per species), and at the same developmental stage. For vegetative structures, only healthy, mature and fully-expanded leaves were collected. For reproductive structures, only open flowers and inflorescence were collected. Seven leaves and seven flowers were collected from each individual plant; each was covered with a moist paper towel and immediately placed inside a plastic sealed bag. These plant samples were stored inside a cooler at approx. 5°C to avoid changes in the tissue water status. Within 2 hours of collection, all plant samples were transferred to a refrigerator at 4°C until freezing resistance determinations were carried out. To avoid senescence and dehydration of the plant samples, freezing resistance determinations were conducted in a field laboratory within 24 hours of the samples' collection.

### **Thermal analysis**



For each species, an expanded mature leaf and an open flower was removed from seven different plant samples taken in the field ( $n = 7$  flowers and 7 leaves per species). Each leaf and flower was attached to a thermocouple (Type T, gauge 30 copper-constantan thermocouples, 2mm diameter of junction; Cole Parmer Instruments, Vernon Hills, IL). For solitary and large flowers, the thermocouple was placed among petals (e.g. *Alstroemeria exerens*, *Scyphanthus elegans*). In small flowers and capitulum type inflorescences (e.g. *Chaetanthera sp*, *Perezia carthamoides*), the thermocouple was placed inside the flower's head in order to make contact with the fertile flowers. Once the thermocouple was secured to the tissue with a padded clamp, the samples were immediately enclosed in a hermetically re-sealable plastic bag. The plastic bags were placed in a cryostat (F34-ME, Julabo Labortechnik GmbH, Germany), and the temperature was decreased from 0 to  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , at a cooling rate of  $5^{\circ}\text{C h}^{-1}$ . The cooling rate was selected according to the maximum cooling rate during natural summer freezing events in the Central Chilean Andes obtained from weather station recordings (HOBO, Onset Computer Corporation) located 1.5 meters above the ground (See Fig. S1 for examples of extreme frost events when the cooling rate reach values close to  $-5^{\circ}\text{C h}^{-1}$ ). The temperature of individual leaves and flowers was monitored every second with a DAQ/32 multi-channel thermocouple USB data acquisition module (USB-2416 connected to an AI-EXP32 expansion module; Measurement Computing Corporation, Norton, MA). The sudden rise in leaf and flower temperature (exotherm) produced by the heat

released during the freezing process was used to determine the ice nucleation temperature (INT). INT is the lowest temperature before the start of the exotherm and indicates the beginning of the formation of ice crystals in the apoplast (Larcher 2003).

### **Assessment of freezing damage**

The temperature that caused 50% damage ( $LT_{50}$ ) in flowers and leaves was estimated by using the membrane electrolyte leakage method (Wilner 1960; Lipp et al. 1994). Single flowers or capitula and leaves from different individuals per species were exposed to 6 independent freezing treatments: -5, -7.5, -10, -12.5, -15, and -20°C. Once each temperature treatment finished, the tubes were removed from the cryostat, and 10 ml of deionized water was then added to each tube. The electrical conductivity (EC) of the solution and the maximum ion leakage by freezing-induced damage were measured with a conductance/resistance meter (Hanna HI 8733, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) and used to estimate the relative electrical conductivity (REC). REC was corrected with the control treatment to obtain a corrected relative EC (REC of the freezing treatment – REC of the control treatment).  $LT_{50}$  was determined by linear interpolation using the temperature that caused the highest corrected REC below 50% and the temperature that caused the lowest corrected REC above 50%. All the  $LT_{50}$  data were obtained from Morales et al. (2020), due to  $LT_{50}$  determinations were made

simultaneously with the thermal analysis, using the same plant individuals (same elevation and date). For full experimental details see Morales et al. (2020).

### **Freezing resistance mechanism**

For each species, the freezing resistance mechanism was determined by comparing the temperature that produced 50% damage ( $LT_{50}$ ) and INT obtained in the thermal analyses. When  $LT_{50}$  occurred at a lower temperature than INT, the plant was classified as tolerant to extracellular ice formation (freezing tolerant, FT). Conversely, when  $LT_{50}$  was minor or not significantly different from INT, the resistance mechanism was classified as freezing avoidance, FA (Squeo et al. 1991; Bravo et al. 2001; Sierra-Almeida et al. 2009, 2010). In the case of FT species, the safety margin was obtained by calculating the difference between  $LT_{50}$  and INT (Sierra-Almeida et al. 2009; Lazarus et al. 2019) and was used as an indicator to quantify how tolerant to freezing each species is. When this margin is narrow, the plant can tolerate little additional ice related stress within its tissues, and any additional freezing poses a hazard of tissue damage (Lazarus et al. 2019).

### **Statistical analyses**

To estimate INT and  $LT_{50}$  differences and determine the freezing resistance mechanism on each organ per species an unpaired two-samples *t*-test was used. Additionally, the non-parametric Wilcoxon test was used when assumptions for

parametric analyses were not met. A linear model (LM) was used to determine the extent of the relationship between  $\Delta\text{INT-LT}_{50}$ , and the independent variables: flower and leaf type, growth form, elevation, and date of measurement, per all annual and perennial species independently. We assumed a Gaussian distribution and checked the normal distribution of model residuals to confirm the goodness of fit. We also checked the plotted residuals of the model to ensure homoscedasticity. A  $\chi^2$  test was used to determine if the observed proportion of the freezing resistance mechanisms (FA and FT) differ with the hypothesized proportion in each LHS. Fisher's Exact Test was used to determine whether the proportions of FA and FT recorded in the annual and perennial species, per flowers and leaves independently, were statistically different. Rstudio (Version 1.1.463 – © 2009-2018 RStudio, Inc.) was used to perform the statistical analyses.

## RESULTS

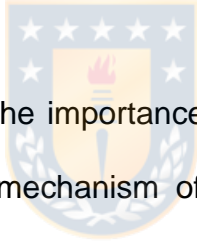
In annual species, ice nucleation temperature (INT) occurred at  $-10^{\circ}\text{C} \pm 0.4$  SE in flowers and leaves (Table 1). These values are similar to the mean freezing resistance temperature ( $\text{LT}_{50}$ ) reported previously for the same species ( $-10.2^{\circ}\text{C} \pm 0.6$  and  $-12^{\circ}\text{C} \pm 0.8$  SE for flowers and leaves, respectively; Table 1). Accordingly, seventy percent ( $n = 7$ ) of annual species were classified as freezing-avoidant (FA) and thirty percent ( $n = 3$ ) as freezing-tolerant (FT), in their flowers

and leaves, respectively (Fig. 1;  $\chi^2 = 3.53$ ,  $df = 1$ ,  $p > 0.05$ ). In FT annual species, the mean safety margin was  $6.4K \pm 0.9$  in flowers, meanwhile in leaves it was  $8.3K \pm 0.9$  (Fig. 2). Linear model indicated that for annual species,  $\Delta INT-LT_{50}$  of flowers was determined by flower type (40%;  $p < 0.001$ ), the date of measurement (22 %;  $p < 0.001$ ), and elevation (5%;  $p < 0.01$ ). In contrast, the  $\Delta INT-LT_{50}$  of leaves was mainly determined by the leaf type (71%;  $p < 0.001$ ) (Table S2).

For perennial species, INT occurred at  $-10.3^\circ\text{C} \pm 0.4$  and  $-9.5^\circ\text{C} \pm 0.4$  SE, in flowers and leaves, respectively (Table 1), meanwhile the mean  $LT_{50}$  was reported at  $-12.9^\circ\text{C} \pm 0.6$  SE and  $-13.2^\circ\text{C} \pm 0.5$  SE in flowers and leaves, respectively (Table 1). Accordingly, fifty seven of perennial species ( $n = 8$ ) were classified as FA and forty three percent ( $n = 6$ ) as FT (Fig. 1;  $\chi^2 = 11.2$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.05$ ) in their flowers. In their leaves, fifty percent of species were classified as FA and fifty percent as FT (Fig. 1;  $\chi^2 = 9.33$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.05$ ; Table S3). In FT perennial species, the mean safety margin was  $6.9K \pm 0.7$  in flowers and  $7.2K \pm 0.9$  in leaves (Fig. 2). Linear model indicated that for perennial species, the  $\Delta INT-LT_{50}$  in flowers was determined by flower type (22%;  $p < 0.001$ ), date of measurement (16%;  $p < 0.01$ ), and growth form (13%;  $p < 0.01$ ). Meanwhile in leaves,  $\Delta INT-LT_{50}$  was determined by leaf type (44%;  $p < 0.001$ ), growth form (14%;  $p < 0.001$ ), and elevation (6.5%;  $p < 0.001$ ) (Table S3). Fisher's Exact Test showed no statistically significant differences in the proportions of FA and FT recorded in the annual and perennial species, neither for flowers ( $p > 0.05$ ) nor for leaves ( $p > 0.05$ ).

Most of the studied species showed the same mechanism of freezing resistance in flowers and leaves (Fig. 3 and Fig. 4). Nevertheless, there were some exceptions. For example, in annual species leaves of *L. microcarpus* were FT whilst flowers were FA; for *M. glacilis* their leaves were FA but their flowers were FT (Table 1, Fig. 3). Similarly, the leaves of perennial species *A. splendens* and *S. graveolens* were FT but their flowers were FA, while *H. comosum* showed freezing avoidant leaves but freezing tolerant flowers (Table 1, Fig. 4).

## DISCUSSION



In this study, we evaluated the importance of life-history strategy (LHS) on the type of freezing-resistance mechanism of flowers and leaves in a subalpine community of the central Chilean Andes. In particular, our results partially supported our hypothesis. As we expected, in annual species avoidance is the principal freezing-resistance mechanism. Nevertheless, tolerance and avoidance mechanisms were almost equally represented among perennial species. Most of the studied species exhibited the same freezing-resistance mechanism in flowers and leaves, indicating that the freezing resistance mechanism is conserved at the whole-plant level. To the best of our knowledge, this study represents the first report that simultaneously shows the freezing resistance mechanism of both flowers and leaves for both perennial and annual species, including the highest number of annual-alpine species reported to date.

As we hypothesized, FA was the main mechanism of freezing resistance among studied annual species and could be explained by the trade-off theory (Stearns 1989; Reich et al. 2003). Contrary to the majority of perennial plant species, which have 'slow' life cycles, annual-plants have 'fast' life cycles (e.g. short lifespan, early maturity and high reproductive rates) (Bazzaz and Morse 1991). To assure the success of their only reproductive event during their lifespan, annual plants have a high growth rate and invest most of their energy and mineral resources into reproduction (Primack 1979; Bazzaz et al. 1987; Hancock and Pritts 1987; Garnier 1992). Resource availability is finite; consequently, the high- resource demands of fast growth and reproduction could produce a trade-off with the freezing-resistance mechanism.

In this sense, annual plants likely avoid or diminished this trade-off through the use of FA mechanisms. Since many avoidance mechanisms have been associated with anatomical features (e.g. supercooling; ice barriers; Kuprian et al. 2014, extraorgan freezing; Ishikawa et al. 2015) they are highly convenient in terms of energy and response time compared with non-constitutive responses. Through these mechanisms, annual plants by-pass the damaging effects of freezing and hence the vital functions and cellular processes are not interrupted, ensuring high growth rates, reproduction, and seed output during its single reproductive cycle. Supporting the above, the results of the linear model showed that  $\Delta\text{INT-LT}_{50}$  in annual species is mainly determined by the flower and leaf type, highlighting the importance of structural traits as part of the mechanism of freezing

resistance in annual plants. In addition, seed germination of annual plants is particularly regulated by environmental signals, which synchronize seedling emergence towards periods of low mortality risk (Bazzaz and Morse 1991). Thus, even for annuals that emerge early in the growing season, when minimum temperatures are near zero in the central Chilean Andes (Sierra-Almeida et al. 2009, Sierra-Almeida and Cavieres 2012), investing resources in FT mechanisms during their vegetative growth stage, may be disadvantageous due to the uncertainty of the occurrence of frost events (Sklenář 2017), and may reduce plant fitness when frost damage does not occur (Agrawal et al. 2004).

Conversely, the use of resources in a more conservative way in perennial plants, as a result of slower growth rates and longer lifespan compared to annual plants, gives them a greater availability of resources to invest in other functions as tolerance mechanisms (Bazzaz and Morse 1991). Likewise, the presence of reserve organs, where non-structural carbohydrates are stored, gives perennial plants the capacity of subsidizing the imbalance produced by the simultaneous demand for resources for both growth and protection and may give perennial plants, over their lifetime, the ability to cope with environmental stresses (Bazzaz and Morse 1991). According to the above, the linear model indicated that  $\Delta\text{INT-LT}_{50}$  in perennial species is determined, in addition to structural traits, by traits associated with environmental conditions as the date of measurement, altitude, and the growth form. These results demonstrated that  $\Delta\text{INT-LT}_{50}$  and, in consequence, the freezing resistance mechanism is more flexible in perennial



plants and can vary according to demands for protection provoke by environmental stresses, which would explain the almost equal representation of both avoidance and tolerance mechanisms in perennial plants. These results are in line with other authors who reported that freezing resistance mechanisms in perennial plants could change throughout the growing season and elevation in response to environmental variables as temperature and water availability (Sierra-Almeida et al. 2009; Sklenář 2017). For perennial species, maintaining freezing resistance strategies, either through tolerance or avoidance mechanisms, could be particularly important to ensure their survival during their long lifespan (Bouzid et al. 2019), as living for multiple seasons implies a high probability of exposure to summer frosts.



Our results showing that FA was the principal mechanism of freezing resistance in annual plants, meanwhile, in perennial species FA and FT mechanisms were almost equally represented, are supported by the analysis of the data reported by Sklenář (2017). Specifically, 3 of 5 annual species studied were FA. In perennial species, both mechanisms were almost equally represented. Even though there were no statistical differences in the proportions of FA and FT recorded in the annual and perennial species, to obtain a similar trend in alpine species from temperate mountain regions validate the biological significance of our findings, and support our hypothesis concerning the effect of LHS on the freezing resistance mechanism. In addition to the above, Bouzid et al. (2019) reported that the mechanism of drought resistance (another dehydrative stress, Xin and

Browse 2000) differed between *Arabidopsis* species according to LHS. The only annual species studied, *Arabidopsis thaliana*, employs a drought avoidance strategy. Meanwhile, the perennial species *A. lyrata* employs a drought tolerance strategy. Another perennial species *A. halleri*, combined avoidance, and tolerance strategies. According to the authors, these strategic differences response to the distinct ecological priorities of the stress-tolerant *A. lyrata*, the competitive *A. halleri*, and the ruderal *A. thaliana*, and are agree with the discussion about the ability of perennial species to change their freezing resistance mechanism in response to abiotic conditions and, even, in the case *A. halleri* in response to biotic interactions.

It is important to note that species of the genus *Chaetanthera* (*C. linearis* and *C. flabellata*) were the only freezing tolerant species among studied annuals (for both organs). Apparently, these species use mixed strategies to withstand temperatures down to -20°C in leaves and flowers. In the first instance, they prevent the ice formation by presenting INT close to -10°C in both tissues. Subsequently, they can tolerate the presence of ice in their tissues, reaching a safety margin in leaves and flowers of 4K in *C. flabellata* and 10K in *C. linearis*. In the case of reproductive structures, this delay in the ice formation may be the result of the arrangement of the flowers in a floral capitulum (Fig. S2 and Fig. S3). Their numerous and small flowers have a spatially compressed arrangement that can maintain steady temperatures inside the inflorescence (LV Morales, UDEC, Concepción, Chile, unpubl. Res). In the same way, the rosette-like arrangement

of the foliaceous implicated bracts surrounded the capitulum can serve as cold isolation morphological strategies (Davies 2013). The above represents a large safety margin for both species, especially considering the characteristics of frost events described for the study area, and reflects a long evolutionary history of the genus to this type of environment (Hershkovitz et al. 2006) since they have achieved high freezing tolerance despite having "fast" life cycles.

In summary, we found a close relationship between the life-history strategy and the freezing-resistance mechanism of herbaceous species in the Central Chilean Andes. Similar relationships have been previously reported for mechanisms to resist drought and herbivory (Kooyers 2015; Bouzid et al. 2019; Agrawal et al. 2004). These findings suggest that regardless of the stressor, annual species tend to be stress-avoidant, while perennial species could exhibit both types of mechanisms according to the environmental condition. Hence, our results constitute a remarkable contribution to the ecological theory about the connection between life history and plant stress response. Although leaves and flowers tend to present the same type of freezing-resistance mechanism reflecting a whole-plant response, some exceptions exist (e.g., *A. splendens*, *H. comosum*, *L. microcarpus*, *M. glacialis*, and *S. graveolens*). Thus, further studies dealing with freezing resistance mechanisms have to include different plant organs/structures to develop a whole plant view of the stress response and consider that freezing avoidance and tolerance mechanisms are not necessarily mutually exclusive.

Indeed, in some cases, they combine to develop a high degree of freezing resistance (e.g. *Chaetanthera*).

**Acknowledgments** We thank Omar and Octavia for their help in the fieldwork, Alicia Marticorena and MAK Mihöc for plant identifications, and Daniel Pascal-Harris for English edition.

**Author contributions** LVM and AS-A conceived and designed the research; LVM, CAC and CS carried out the collection and data analysis. LVM interpreted the resulted and wrote the manuscript with support from AS-A and AS.

**Funding** This work was supported by The National Commission for Science and Technology (CONICYT) through the National Fund for Scientific and Technological Development FONDECYT 11150710 (AS-A), Doctoral Scholarship CONICYT 21151063.

### **Compliance with ethical standards**

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** This study does not involve research on human participants or animals.

**Informed consent** Informed consent was obtained from all individual participants included in the study

## REFERENCES

Agrawal AA, Conner JK, Stinchcombe JR (2004) Evolution of plant resistance and tolerance to frost damage. *Ecol Lett* 7:1199–1208.

Augspurger CK (2009). Spring 2007 warmth and frost: phenology, damage and refoliation in a temperate deciduous forest. *Funct Ecol* 23:1031–1039.

Azócar A, Rada F, Goldstein G (1988) Freezing tolerance in *Draba chionophila*, a miniature caulescent rosette species. *Oecologia* 75: 156-160.

Bazzaz, FA, Chiariello NR, Coley PD, Pitelka LF (1987) Allocating resources to reproduction and defense. *BioScience* 37:58-67

Bazzaz FA, Morse FBS (1991) Annual plants: potential responses to multiple stresses. In: Mooney HA, Winner WE, Pell EJ (ed) *Response of plants to multiple stresses*. Academic Press, San Diego, pp 283–305

Beck E, Senser M, Scheibe R, Steiger HM, Pongratz P (1982) Frost avoidance and freezing tolerance in Afroalpine giant rosette plants. *Plant Cell Environ* 5: 215–222.

Beck E (1994) Cold tolerance in tropical alpine plants. In: Rundel PW, Smith AP, Meinzer FC (ed) *Tropical alpine environments. Plant form and function*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 77–110.

Bouzig M, He F, Schmitz G, Häusler RE, Weber APM, Mettler-Altman T, De Meaux J (2019) *Arabidopsis* species deploy distinct strategies to cope with drought stress. *Ann Bot* 124: 27–40.

Bucher SF, Feiler R, Buchner O, Neuner G, Rosbakh S, Leiterer M, Römermann C (2019) Temporal and spatial trade-offs between resistance and performance traits in herbaceous plant species. *Environ Exp Bot* 157: 187–196.

Bravo LA, Ulloa N, Zúñiga GE, Casanova A, Corcuera LJ, Alberdi M (2001) Cold resistance in Antarctic angiosperms. *Physiol Plant* 111: 55–65.

CaraDonna PJ, Bain JA (2016) Frost sensitivity of leaves and flowers of subalpine plants is related to tissue type and phenology. *J Ecol* 104: 55–64.

Davies AM (2013) Hairy Anthers & Mountain Stars: the speciation of Andean Asteraceae in response to geological and climate change. *Arch.Sci* 66: 69-84.

Garnier E (1992) Growth analysis of congeneric annual and perennial grass species. *J Ecol* 80: 665–675.

Goldstein G, Rada F, Azócar A (1985) Cold hardiness and supercooling along an altitudinal gradient in Andean giant rosette species. *Oecologia* 68:147-152.

- Gusta LV, Wisniewski M (2013) Understanding plant cold hardiness: an opinion. *Physiol Plant* 147: 4–14.
- Hancock JF, Pritts MP (1987) Does reproductive effort vary across different life forms and seral environments? A review of the literature. *Bull Torrey Bot Club* 114: 53–59.
- Hershkovitz MA, Arroyo MTK, Bell C, Hinojosa LF (2006) Phylogeny of *Chaetanthera* (Asteraceae: Mutisieae) reveals both ancient and recent origins of high elevation lineages. *Mol Phylogenet Evol* 41:594- 605.
- Hekneby M, Antolín MC, Sánchez-Díaz M (2006) Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes. *Environ Exp Bot* 55: 305-314.
- Hughes MA, Dunn MA (1996) The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J Exp Bot* 47: 291–305.
- Ishikawa M, Toyomasu T, Aoki T, Price WS (2015) Ice nucleation activity in various tissues of *Rhododendron* flower buds: their relevance to extraorgan freezing. *Front Plant Sci* 6:149 doi:10.3389/fpls.2015.00149.
- Inouye DW (2000) The ecological and evolutionary significance of frost in the context of climate change. *Ecol Lett* 3: 457–463.
- Körner C (2003) *Alpine plant life: functional plant ecology of high mountain ecosystems; with 47 tables*, 2nd edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Berlin.
- Körner C (2016) When it gets cold, plant size matters – a comment on treeline. *J Veg Sci* 27:6–7.
- Kooyers NJ (2015) The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. *Plant Sci* 234: 155–162.
- Kuprian E, Briceño VF, Wagner J, Neuner G (2014) Ice barriers promote supercooling and prevent frost injury in reproductive buds, flowers and fruits of alpine dwarf shrubs throughout the summer. *Environ Exp Bot* 106: 4–12
- Ladinig U, Hacker J, Neuner G, Wagner J (2013) How endangered is sexual reproduction of high-mountain plants by summer frosts? Frost resistance, frequency of frost events and risk assessment. *Oecologia* 171: 743–760.
- Larcher W (2003) *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer Science & Business Media.
- Lazarus BE, Germino MJ, Richardson BA (2019) Freezing resistance, safety margins, and survival vary among big sagebrush populations across the western United States. *Am J Bot* 106(7): 922–934.

- Lenz A, Hoch G, Vitasse Y, Körner C (2013) European deciduous trees exhibit similar safety margins against damage by spring freeze events along elevational gradients. *New Phytol* 200: 1166–1175.
- Levitt J (1980) Responses of plants to environmental stress, vol. 1: Chilling, freezing, and high temperature stresses. Academic Press, NY, NY, USA.
- Lipp CC, Goldstein G, Meinzer FC, Niemczura W (1994) Freezing tolerance and avoidance in high-elevation Hawaiian plants. *Plant Cell Environ* 17: 1035–1044.
- Márquez EJ, Rada F, Farinas MR (2006) Freezing tolerance in grasses along an altitudinal gradient in the Venezuelan Andes. *Oecologia* 150: 393–397.
- Melcher P, Goldstein G, Meinzer F, Minyard B, Giambelluca T, Lope L (1994) Determinants of thermal balance in the Hawaiian giant rosette plant, *Argyroxiphium sandwicense*. *Oecologia* 98: 412–418.
- Morales LV, Alvear C, Sanfuentes C, Saldaña A, Sierra- Almeida A (2020) Does the life-history strategy determine the freezing resistance of flowers and leaves of alpine herbaceous species? *Alp Bot.* <https://doi.org/10.1007/s00035-020-00236-5>
- Neuner G, Beikircher B (2010) Critically reduced frost resistance of *Picea abies* during sprouting could be linked to cytological changes. *Protoplasma* 243: 145–152.
- Primack R (1979) Reproductive Effort in Annual and Perennial Species of *Plantago* (Plantaginaceae). *Am Nat* 114: 51–62. Rada F., Goldstein G., Azocar A. & Meinzer F (1985) Daily and seasonal osmotic changes in a tropical treeline species. *Journal of Experimental Botany* 36, pp. 987–1000.
- Rada F, Goldstein G, Azocar A, Torres F (1987) Supercooling along an altitudinal gradient in *Espeletia schultzii*, a caulescent giant rosette species. *Environ Exp Bot* 38: 491–497.
- Reich PB, Wright IJ, Cavender-Bares J, Craine JM, Oleksyn J, Westoby M, Walters MB (2003) The evolution of plant functional variation: traits, spectra, and strategies. *Int J Plant Sci* 164: 143–164.
- Sakai A, Larcher W (1987) Frost survival of plants: responses and adaptation to freezing stress. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Santibañez F, Uribe J (1990) Atlas Agroclimático de Chile. Regiones V y Metropolitana. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Santiago.
- Sierra-Almeida A, Cavieres LA, Bravo LA (2009) Freezing resistance varies within the growing season and with the elevation in high-Andean species of central Chile. *New Phytol* 182: 461–469.



Sierra-Almeida A, Cavieres LA, Bravo LA (2010) Freezing resistance of high elevation plant species is not related to their height or growth-form in the central Chilean Andes. *Environ Exp Bot* 69:273–278.

Sierra-Almeida A, Cavieres LA (2012) Summer freezing resistance of high-elevation plant species changes with ontogeny. *Environ Exp Bot* 80:10–15.

Sklenář P, Kučerová A, Macek P, Macková J (2010) Does plant height determine the freezing resistance in the páramo plants? *Austral Ecol* 35: 929–934.

Sklenář, P (2017) Seasonal variation of freezing resistance mechanisms in north temperate alpine plants. *Alp Bot* 127: 31–39.

Squeo FA, Rada F, Azócar A, Goldstein G (1991) Freezing tolerance and avoidance in high tropical Andean plants-is it equally represented in species with different plant height? *Oecologia* 86: 378–382

Squeo FA, Rada F, García C, Ponce M, Rojas A, Azócar A (1996) Cold resistance mechanisms in high desert Andean plants. *Oecologia* 105: 552–555.

Stearn SC (1989) Trade-Offs in Life-History Evolution. *Funct Ecol* 3: 259–268.

Strand Å, Foyer CH, Gustafsson P, Gardeström P, Hurry V (2003) Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant Cell Environ* 26: 523–535.

Taschler D, Neuner G (2004) Summer frost resistance and freezing patterns measured in situ in leaves of major alpine plant growth forms in relation to their upper distribution boundary. *Plant Cell Environ* 27: 737–746.

Teillier S, Marticorena A, Niemeyer HM (2011) Flora Altoandina de Santiago. Guía para la identificación de las especies de las cuencas del Maipo y del Mapocho. Universidad de Chile, Santiago.

Uemura M, Steponkus P (1994) A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. *Plant Physiol* 104: 479–496.

Vitasse Y, Lenz A, Körner C (2014) The interaction between freezing tolerance and phenology in temperate deciduous trees. *Front Plant Sci* 5: 541. <http://doi.org/10.3389/fpls.2014.00541>.

Wilner J (1960) Relative and absolute electrolytic conductance tests for frost hardiness of apple varieties. *Can J Plant Sci* 40: 630–637.

Wingler A (2015) Comparison of signalling interactions determining annual and perennial plant growth in response to low temperature. *Front Plant Sci* 5:794. <http://doi: 10.3389/fpls.2014.00794>.



Xin Z, Browse J (2000) Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant Cell Environ* 23: 893–902.



**Table 1.** Freezing resistance of flowers and leaves of 24 species from the central Chilean Andes measured during the growing season. Parameters: INT, ice nucleation temperature; LT50, temperature producing 50% damage and Mechanisms: FA, freezing avoidance; FT, freezing tolerance. Values are shown as mean  $\pm$  standard error. LT50 were obtained from Morales et al. (2020).

Species	Family	Flowers			Leaves		
		INT (°C)	LT <sub>50</sub> (°C)	Mechanism	INT (°C)	LT <sub>50</sub> (°C)	Mechanism
<b>Annual species</b>							
<i>Chaetanthera flabellata</i>	Asteraceae	-9.4 $\pm$ 0.7	-12.9 $\pm$ 0.2	FT	-15.5 $\pm$ 0.7	-20.0 $\pm$ 0.0	FT
<i>Chaetanthera linearis</i>	Asteraceae	-9.0 $\pm$ 0.9	-20.0 $\pm$ 0.0	FT	-9.5 $\pm$ 0.9	-20.0 $\pm$ 0.0	FT
<i>Collomia biflora</i>	Polemoniaceae	-11.6 $\pm$ 0.9	-9.1 $\pm$ 0.9	FA	-9.8 $\pm$ 1.1	-6.6 $\pm$ 0.5	FA
<i>Lupinus microcarpus</i>	Fabaceae	-10.7 $\pm$ 1.1	-9.9 $\pm$ 0.9	FA	-8.5 $\pm$ 1.2	-20.0 $\pm$ 0.0	FT
<i>Madia sativa</i>	Asteraceae	-7.8 $\pm$ 0.2	-6.4 $\pm$ 0.4	FA	-8.4 $\pm$ 0.2	-9.3 $\pm$ 1.1	FA
<i>Microsteris gracilis</i>	Polemoniaceae	-12.2 $\pm$ 1.4	-17.9 $\pm$ 0.3	FT	-11.9 $\pm$ 1.1	-8.2 $\pm$ 0.6	FA
<i>Phacelia brachyantha</i>	Boraginaceae	-15.0 $\pm$ 0.9	-5.5 $\pm$ 0.4	FA	-7.0 $\pm$ 0.3	-8.1 $\pm$ 0.4	FA
<i>Quinchamalium parviflorum</i>	Schoepfiaceae	-10.5 $\pm$ 0.6	-7.4 $\pm$ 0.6	FA	-10.7 $\pm$ 1.0	-11.8 $\pm$ 0.4	FA
<i>Schizanthus hookeri</i>	Solanaceae	-8.1 $\pm$ 0.5	-7.8 $\pm$ 0.6	FA	-8.6 $\pm$ 0.9	-7.3 $\pm$ 0.5	FA
<i>Scyphanthus elegans</i>	Loasaceae	-6.8 $\pm$ 0.5	-6.5 $\pm$ 0.2	FA	-8.2 $\pm$ 0.2	-7.0 $\pm$ 0.8	FA
<b>Total Mean</b>		<b>-10.1 <math>\pm</math> 0.4</b>	<b>-10.2 <math>\pm</math> 0.6</b>		<b>-9.8 <math>\pm</math> 0.4</b>	<b>-11.8 <math>\pm</math> 0.7</b>	
<b>Perennial species</b>							
<i>Acaena splendens</i>	Rosaceae	-14.6 $\pm$ 1.1	-14.4 $\pm$ 1.1	FA	-5.9 $\pm$ 0.12	-20.0 $\pm$ 0.0	FT
<i>Alstroemeria exerens</i>	Alstroemeriaceae	-6.6 $\pm$ 0.2	-6.2 $\pm$ 0.4	FA	-8.5 $\pm$ 0.7	-10.6 $\pm$ 1.0	FA
<i>Barneoudia chilensis</i>	Ranunculaceae	-9.9 $\pm$ 1.1	-11.0 $\pm$ 2.1	FA	-7.2 $\pm$ 0.5	-7.8 $\pm$ 0.4	FA
<i>Calceolaria segethii</i>	Calceolariaceae	-7.6 $\pm$ 1.12	-9.1 $\pm$ 0.6	FA	-6.3 $\pm$ 0.8	-6.3 $\pm$ 0.4	FA
<i>Draba gilliesii</i>	Brassicaceae	-11.9 $\pm$ 0.4	-20.0 $\pm$ 0.0	FT	-10.1 $\pm$ 0.4	-12.7 $\pm$ 0.8	FT
<i>Hordeum comosum</i>	Poaceae	-11.5 $\pm$ 0.5	-14.3 $\pm$ 1.0	FT	-12.1 $\pm$ 1.11	-11.8 $\pm$ 0.9	FA

<i>Ipheion sessile</i>	Liliaceae	-5.3 ± 0.1	-10.4 ± 1.1	FT	-8.4 ± 0.6	-13.4 ± 1.0	FT
<i>Olsynium junceum</i>	Iridaceae	-12.3 ± 0.3	-19.9 ± 0.1	FT	-10.8 ± 0.9	-15.5 ± 0.9	FT
<i>Oxalis cinerea</i>	Oxalidaceae	-8.0 ± 0.5	-8.3 ± 0.3	FA	-13.1 ± 0.9	-17.5 ± 1.2	FA
<i>Perezia carthamoides</i>	Asteraceae	-9.3 ± 0.5	-17.7 ± 1.3	FT	-10.4 ± 0.5	-12.4 ± 1.0	FT
<i>Poa holciformis</i>	Poaceae	-11.8 ± 2.1	-8.9 ± 0.8	FA	-8.4 ± 0.7	-7.3 ± 0.3	FA
<i>Sanicula graveolens</i>	Apiaceae	-9.7 ± 1.0	-6.8 ± 0.3	FA	-12.2 ± 1.0	-17.0 ± 1.2	FT
<i>Senecio polygaloides</i>	Asteraceae	-6.9 ± 0.3	-20.0 ± 0.0	FT	-6.2 ± 0.1	-20.0 ± 0.0	FT
<i>Stachys philippiana</i>	Lamiaceae	-16.8 ± 0.5	-8.5 ± 0.8	FA	-14.1 ± 1.1	-10.5 ± 0.4	FA
<b>Total Mean</b>		<b>-9.5 ± 0.4</b>	<b>-12.3 ± 0.6</b>		<b>-10.3 ± 0.4</b>	<b>-12.8 ± 0.5</b>	



## Figure legends

**Fig. 1** Percentage of total annual and perennial herbs species that showed freezing avoidance or tolerance mechanism in flowers (A) and leaves (B). **A.** Light purple: Freezing avoidant (FA); Purple: freezing tolerant (FT). **B.** Light green: Freezing avoidant (FA); Green: freezing tolerant.

**Fig. 2** Freezing safety margin ( $LT_{50}$ -INT) for freezing tolerant species determined in (A) flowers of annual (light purple) and perennial (purple) species; and (B) leaves of annual (light green) and perennial (green) species. Abbreviations species: **Cf**, *Chaetanthera flabellata*; **Cl**, *Chaetanthera linearis*; **Lm**, *Lupinus microcarpus*, and **Mg**, *Microsteris gracilis*. For tolerant perennial herbs species: **As**, *Acaena splendens*; **Dg**, *Draba gilliesii*; **Hc**, *Hordeum comosum*; **Is**, *Ipheion sessile*; **Oj**, *Olsynium junceum*; **Pc**, *Perezia carthamoides*; **Sg**, *Sanicula graveolens*; **Sp**, *Senecio polygaloides*. Values are means  $\pm$  SE.

**Fig. 3** Ice nucleation temperatures (INT, °C) in flowers (purple bars) and leaves (green bars) of annual species are shown in comparison to mean values (blue circles) and the minimum and maximum values (range) of freezing resistance of flowers and leaves (blue lines).. The boxes indicate the median (second quartile; line inside the box) and extend from the first to the third quartile. The whiskers show at maximum the 1.5-fold interquartile range. **Cb**, *Collomia biflora*; **Cf**, *Chaetanthera flabellata*; **Cl**, *Chaetanthera linearis*; **Lm**, *Lupinus microcarpus*; **Mg**, *Microsteris gracilis*; **Ms**, *Madia sativa*; **Pb**, *Phacelia brachyantha*; **Qp**, *Quinchamalium parviflorum*; **Se**, *Scyphanthus elegans*; **Sh**, *Schizanthus hookeri*.

**Fig. 4** Ice nucleation temperatures (INT, °C) in flowers (purple bars) and leaves (green bars) of perennial species are shown in comparison to mean values (blue circles) and the minimum and maximum values (range) of freezing resistance of flowers and leaves (blue lines).. The boxes indicate the median (second quartile; line inside the box) and extend from the first to the third quartile. The whiskers show at maximum the 1.5-fold interquartile range. **Ae**, *Alstroemeria exerens*; **As**, *Acaena splendens*; **Bc**, *Barneoudia chilensis*; **Cs**, *Calceolaria segethii*; **Dg**, *Draba gilliesii*; **Hc**, *Hordeum comosum*; **Is**, *Ipheion sessile*; **Oj**, *Olsynium junceum*; **Oc**, *Oxalis cinerea*; **Pc**, *Perezia carthamoides*; **Ph**, *Poa holciformis*; **Sg**, *Sanicula graveolens*; **Sp**, *Senecio polygaloides*; **Sph**, and *Stachys philippiana*.



Fig. 1

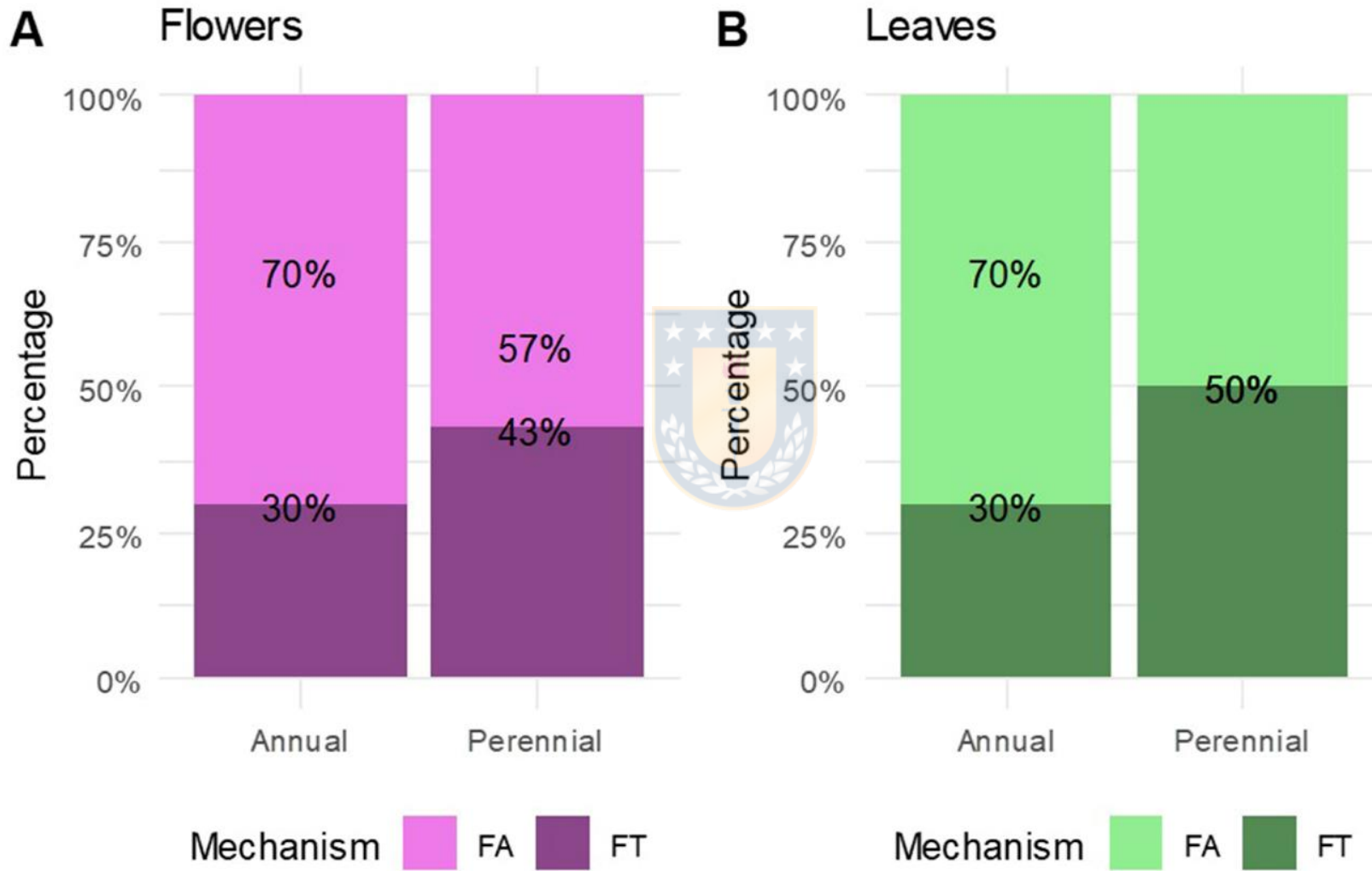


Fig. 2

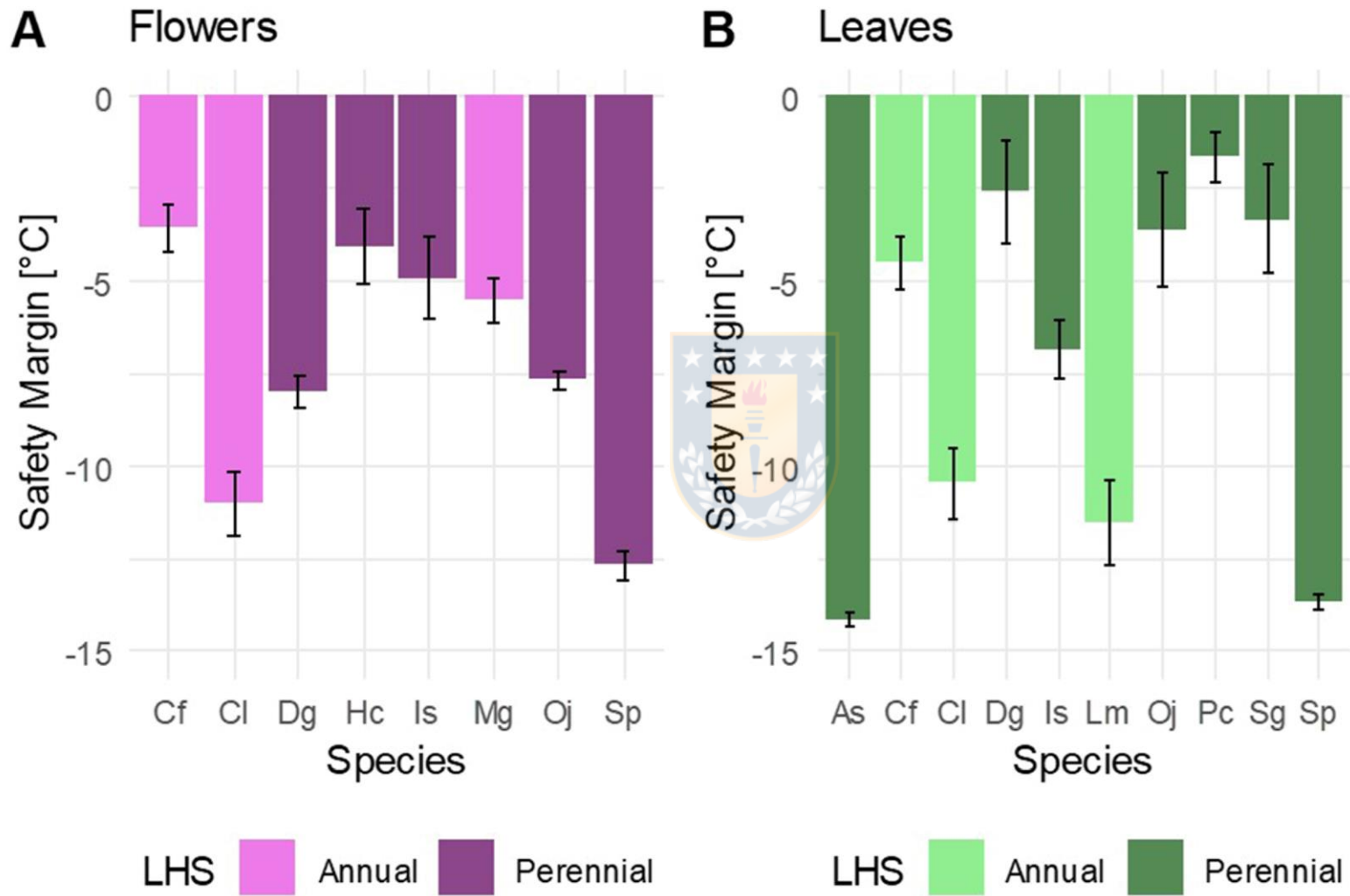


Fig. 3

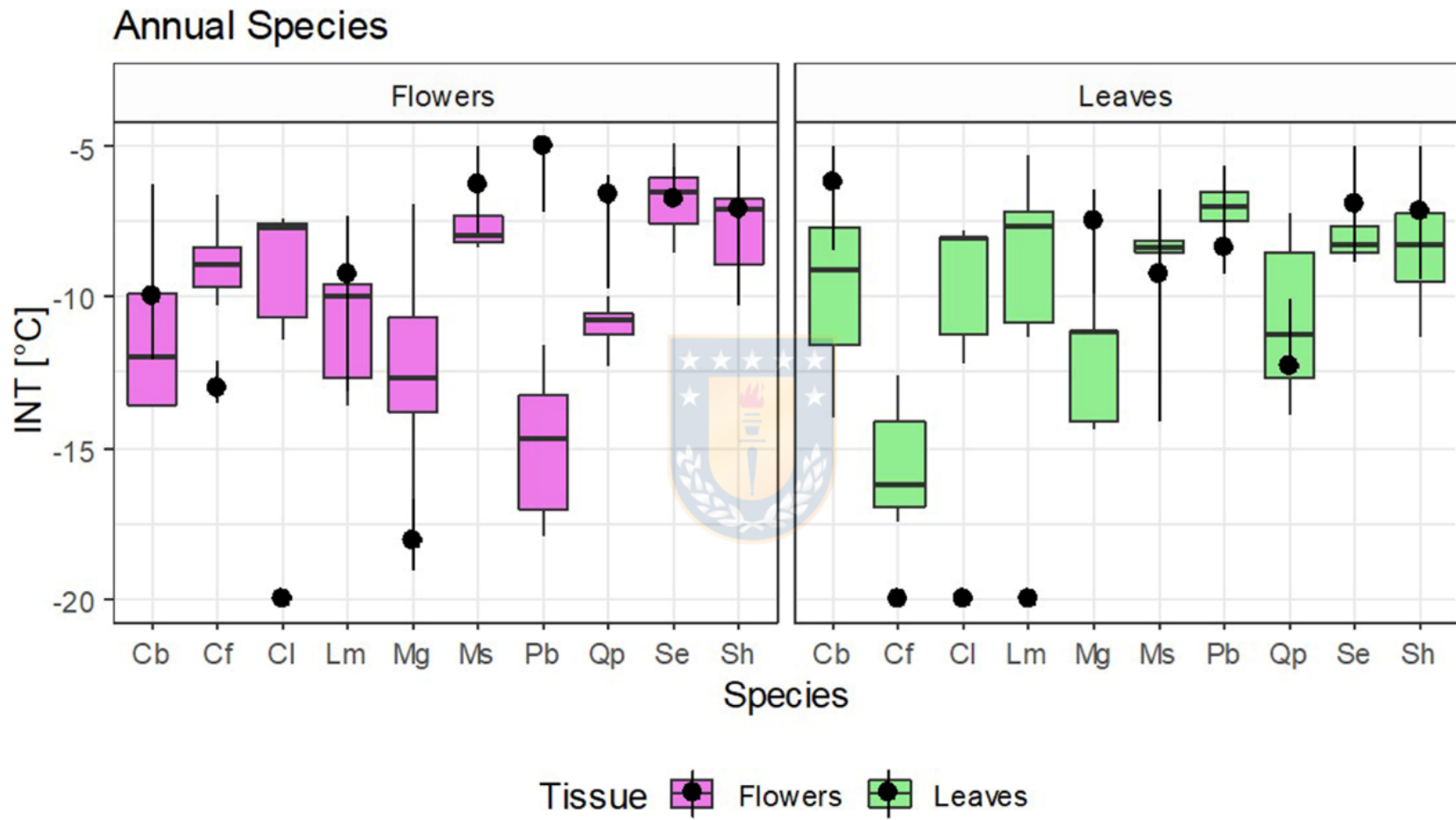
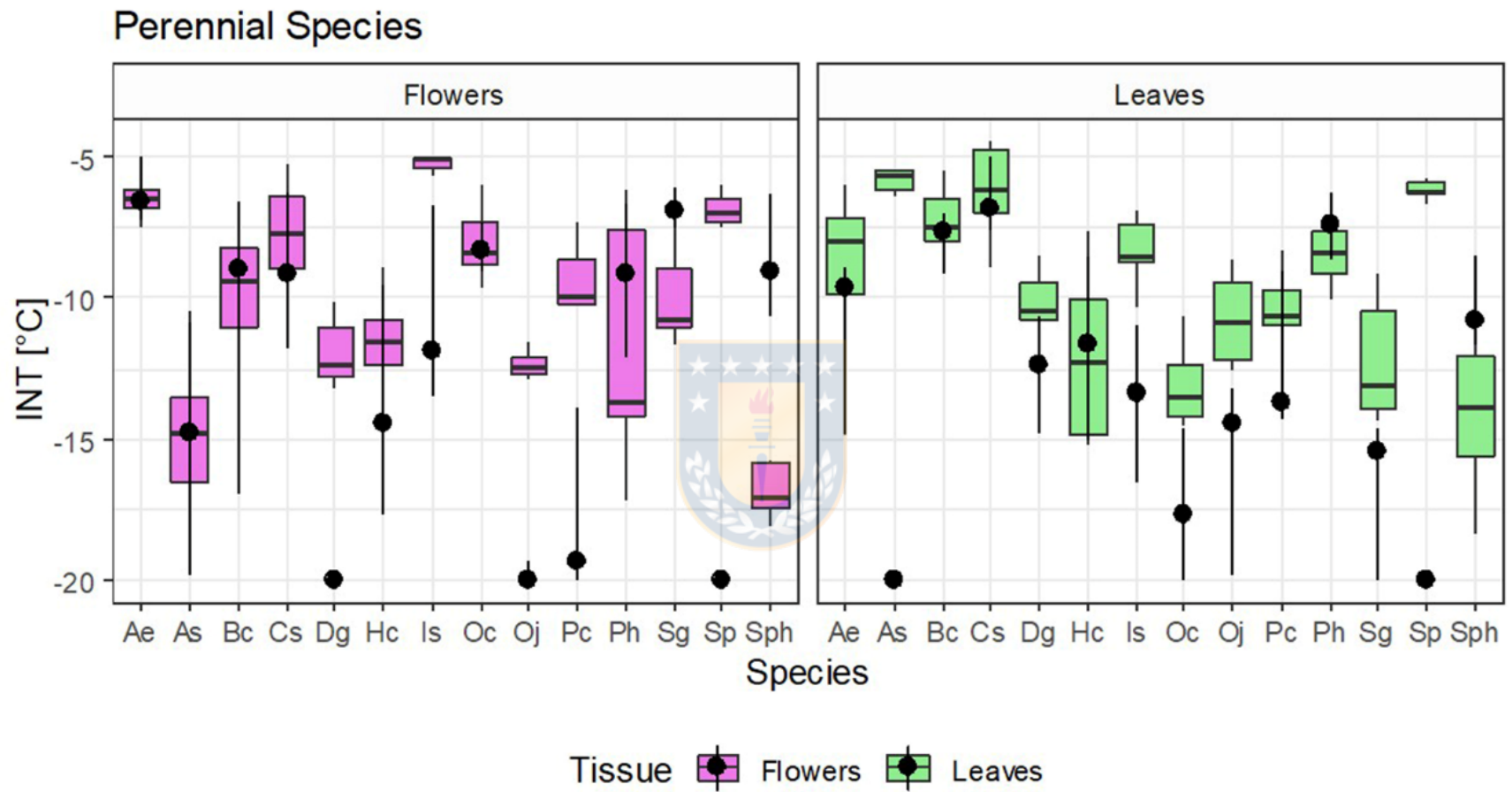




Fig. 4



**Supplemental Information for “Annual and perennial high-Andes species have a contrasting freezing-resistance mechanism to cope with summer frosts”**

Loreto V. Morales\*<sup>1</sup>, Carla Alvear<sup>1</sup>, Camila Sanfuentes<sup>2,3</sup>, Alfredo Saldaña<sup>1</sup> and Ángela Sierra-Almeida<sup>1</sup>

**Manuscrito publicado en Alpine Botany:**

Morales, L.V., Alvear, C., Sanfuentes, C. et al. Annual and perennial high-Andes species have a contrasting freezing-resistance mechanism to cope with summer frosts. *Alp Botany* 130, 169–178 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00035-020-00239-2>



2

Additional supporting information contains the following:

**Table S1** General characteristics of the frost events that occur during the growing season in the Andes of central Chile.....2

**Fig. S1.** Examples of extreme frost events that occurs during the growing season in the Andes of central Chile.....3

**Table S1.** Analysis of variance to assess the effect of flower and leaf type, growth form, elevation, and date of measurement on  $\Delta$ INT-LT<sub>50</sub> of annual species.....4

**Table S2.** Analysis of variance to assess the effect of flower and leaf type, growth form, elevation, and date of measurement on  $\Delta$ INT-LT<sub>50</sub> of perennial species.....5

**Fig. S2** *Chaetanthera linearis*: habit, lateral and top view of the inflorescence growing at 2200 m a.s.l. in Farellones (Chile).....6

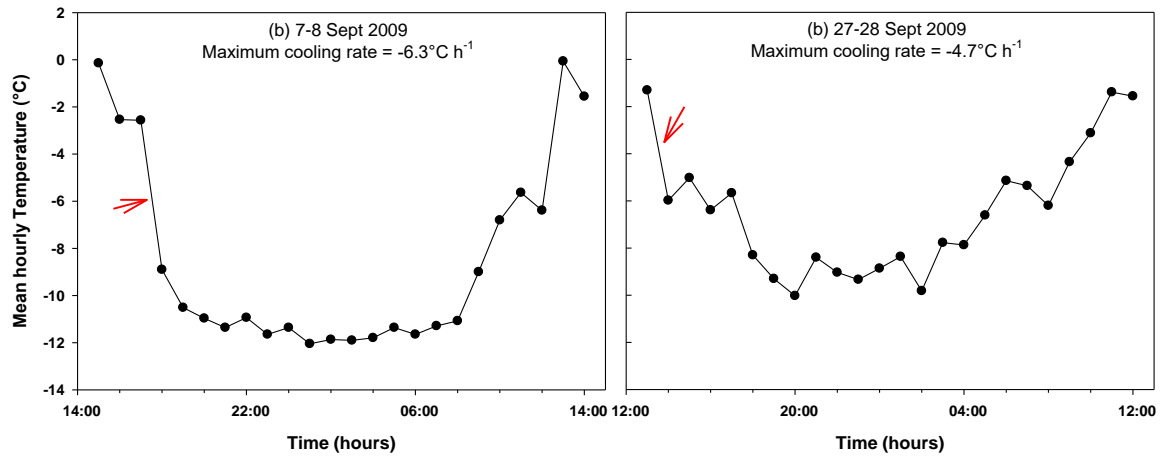
**Fig. S3.** *Chaetanthera flabellata*: view of the inflorescence and flower arrangement and individual at 2200 m a.s.l. in Farellones (Chile).....7



**Table S1.** General characteristics of the frost events that occur during the growing season in the central Chilean Andes (Morales et al. 2020).

Elevation (m a.s.l)	Growing season year	Daily mean temperature (°C)	Daily mean minimum temperature (°C)	Daily mean maximum temperature (°C)	Number of frosts	Frost intensity (°C)	Frost Duration (hrs. below 0°C)	Absolute minimum temperature (°C)	Date of Min. Temperature (day/month/year)
<b>2200</b>	2017-2018	17.7 ± 0.2	6.4 ± 0.3	35.6 ± 0.9	2	-0.4 ± 0.4	1	-0.9	21-11-17
	2009-2010	5.9 ± 0.4	2.6 ± 0.5	9.7 ± 0.4	59	-1.7 ± 0.2	11.9 ± 2.0	-12.1	05-09-09
<b>2800</b>	2011-2012	7.9 ± 0.3	4.7 ± 0.3	11.3 ± 0.3	26	-1.4 ± 0.3	14.2 ± 4.4	-10.7	06-09-11
	2013-2014	8.3 ± 0.3	5.8 ± 0.3	12.0 ± 0.3	13	-0.9 ± 0.2	6.2 ± 1.9	-4.6	10-11-13
	2014-2015	9.6 ± 0.3	6.6 ± 0.3	12.8 ± 0.3	7	-1.2 ± 0.4	13 ± 5.9	-5.3	29-11-14
	2017-2018	13.5 ± 0.2	3.4 ± 0.2	28.7 ± 0.7	27	-1.5 ± 0.1	4.4 ± 0.6	-5.3	16-11-17

\*Air temperature data were recorded every 1 hour at weather stations (HOBO micro station, Onset Computer Corporation) located 1.5 meters above the ground. For the growing season 2017-2018 data were recorded with a Temperature/Relative Humidity Data Logger (HOBO Pro v2.6 Ext., Onset Computer Corporation) located 50 cm above the ground. Standard error (SE) in all cases is standard error of the mean.



**Fig. S1** Examples of extreme frost events when the cooling rate reach values close to  $-5^{\circ}\text{C h}^{-1}$ . Hourly air temperature data were recorded at weather stations (HOBO micro station, Onset Computer Corporation) located 1.5 meters above the ground. The red arrows indicate the maximum cooling rate of every frost event (Morales et al. 2020).

**Table S1.** Analysis of variance to assess the effect of flower and leaf type, growth form, elevation, and date of measurement on  $\Delta\text{INT-LT}_{50}$  of annual species.

Significant p-values are highlighted in bold.

<b>Flowers</b>						
<b>Effect</b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>p-value</b>	<b>Explained variance [%]</b>
Flower type	3	836.7	278.9	21.6	<b>3.22E-09</b>	<b>39.9</b>
Growth form	1	11.8	11.8	0.9	0.3438	0.6
Elevation	1	113.9	113.9	8.8	<b>0.0045</b>	<b>5.4</b>
Date	3	464.4	154.8	12.0	<b>4.43E-06</b>	<b>22.1</b>
Residuals	52	671.5	12.9			32.0
<b>Leaves</b>						
<b>Effect</b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>p-value</b>	<b>Explained variance [%]</b>
Leaf type	5	1100.8	220.2	25.6	<b>2.21E-12</b>	<b>70.8</b>
Growth form	1	3.5	3.5	0.4	0.5278	0.2
Elevation	1	25.4	25.4	3.0	0.0919	1.6
Date	2	22.1	11.1	1.3	0.2856	1.4
Residuals	47	403.6	8.6			25.9



**Table S2.** Analysis of variance to assess the effect of flower and leaf type, growth form, elevation, and date of measurement on  $\Delta\text{INT-LT}_{50}$  of perennial species.

Significant p-values are highlighted in bold.

<b>Flowers</b>						
<b>Effect</b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>p-value</b>	<b>Explained variance [%]</b>
Flower type	5	642.6	128.5	5.3	<b>4.44E-04</b>	<b>22.0</b>
Growth form	3	374.6	124.9	5.1	<b>0.0032</b>	<b>12.8</b>
Elevation	1	4.8	4.8	0.2	0.6570	0.2
Date	6	464.5	77.4	3.2	<b>0.0089</b>	<b>15.9</b>
Residuals	59	1434.1	24.3			49.1
<b>Leaves</b>						
<b>Effect</b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>p-value</b>	<b>Explained variance [%]</b>
Leaf type	6	1201.2	200.2	14.3	<b>3.56E-10</b>	<b>44.2</b>
Growth form	3	387.7	129.2	9.3	<b>3.80E-05</b>	<b>14.3</b>
Elevation	1	175.3	175.3	12.6	<b>0.0008</b>	<b>6.4</b>
Date	7	87.9	12.6	0.9	0.5127	3.2
Residuals	62	865.4	14.0			31.8

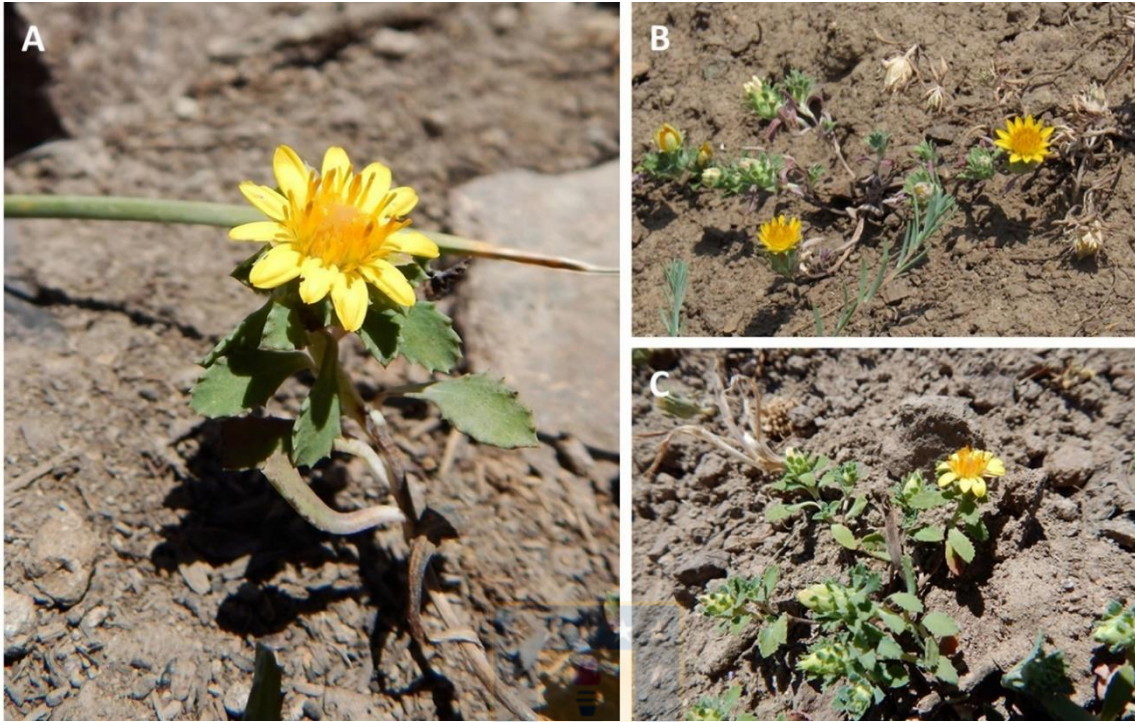


**Figure S2.** *Chaetanthera linearis*. **A** individual at 2200 m a.s.l. in Farellones (Chile); **B** lateral view of the inflorescence; **C** top view of the inflorescence and flower arrangement.





**Figure S3.** *Chaetanthera flabellata*. **A** view of the inflorescence and flower arrangement; **B** and **C** individual at 2200 m a.s.l. in Farellones (Chile).



### CAPÍTULO III

#### **Lo esencial es visible a los ojos: Importancia de la arquitectura y morfología de las flores en el patrón de propagación del hielo en plantas alpinas**

Loreto V. Morales\*1, Gilbert Neuner2 y Ángela Sierra-Almeida1

1 Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile

2 University of Innsbruck, Department of Botany, Unit Functional Plant Biology, Sternwartestr. 15, 6020 Innsbruck, Austria

\*Autor de correspondencia, E-mail: [loretomorales@udec.cl](mailto:loretomorales@udec.cl)

**Palabras claves:** Arquitectura de las plantas, mecanismos de evasión del congelamiento, barreras estructurales de propagación de hielo, barreras térmicas de propagación de hielo, desacople térmico.

## RESUMEN

En ecosistemas de alta montaña, los eventos de heladas durante la estación de crecimiento pueden tener consecuencias negativas para el crecimiento, supervivencia y reproducción de las plantas. A pesar de que se reconoce que la evasión es un mecanismo adaptativo de resistencia al congelamiento, en los últimos años, pocas investigaciones se han dedicado a comprender los mecanismos subyacentes y su regulación. Para abordar esta problemática, en este estudio investigamos los mecanismos estructurales de evasión del congelamiento en especies anuales y perennes a través del análisis de termografía de infrarrojos. En particular, nos preguntamos si existen diferencias en la frecuencia y efectividad de las barreras estructurales de propagación de hielo (BEPH) y barreras térmicas de propagación de hielo (BTPH) entre especies anuales y perennes, y cómo éstas se relacionan con la resistencia al congelamiento. Al analizar los patrones de congelamiento encontramos que tanto especies anuales y perennes presentan BEPH, no existiendo diferencias en la frecuencia (86% y 57% respectivamente presentaban BEPH). Asimismo, fue la arquitectura y la morfología de las inflorescencias y no la estrategia de historia de vida (LHS) la que determinó la presencia de BTPH, siendo las inflorescencias de tipo capítulo, umbela y cima las que presentaron BTPH. A pesar de que la presencia de BEPH y BTPH fue independiente de la LHS, la relevancia de estos mecanismos sí varió según la LHS. En las especies anuales estudiadas, las BEPH y BTPH determinaron el grado de resistencia al congelamiento de las flores, ya que éstas no toleran la formación de hielo. Por el contrario, en especies perennes, las cuales fueron principalmente

tolerantes al congelamiento, la contribución de estos mecanismos de evasión a la resistencia al congelamiento fue menor. Sin embargo, en la mayoría de las especies perennes, la combinación de mecanismos de evasión y tolerancia les confiere un mayor grado de resistencia a los eventos de heladas durante la estación de crecimiento, lo que podría ser uno de los factores que determinan su dominancia en estos ambientes.



## INTRODUCCIÓN

Entre los factores ambientales que predominan en alta montaña, las bajas temperaturas operan como un filtro de selección altitudinal y fuerza de adaptación (Larcher 2003). Por encima del límite de crecimiento de los árboles, las temperaturas del aire se vuelven más extremas y por lo tanto limitantes para las plantas (Larcher et al. 2010). Por este motivo, sólo aquellas plantas de montaña especializadas pueden sobrevivir en estas altas altitudes (Larcher et al. 2010). Las bajas temperaturas en alta montaña se producen durante todo el año, pero sus consecuencias negativas para las plantas son mayores durante la temporada de crecimiento (Körner 2003). De hecho, los eventos de heladas pueden incluso provocar efectos letales en las plantas que están creciendo activamente, en particular, si su resistencia a las heladas es escasa o nula. Las consecuencias de estos eventos incluyen una reducción de la expansión y el crecimiento foliar (Gerdol et al. 2013), así como daño en las hojas, brotes apicales (Rixen et al. 2012) y órganos reproductivos (Bokhorst et al. 2008; Gerdol et al. 2013). Lo anterior podría disminuir directamente la supervivencia y el reclutamiento y, por lo tanto, desempeñar un papel importante en la estructura de poblaciones y comunidades de plantas alpinas (CaraDonna & Bain 2016).

En general, se ha descrito que la supervivencia a las bajas temperaturas puede garantizarse mediante el uso de mecanismos fisiológicos de tolerancia y/o de evasión (Levitt 1980). Los mecanismos de tolerancia al congelamiento han sido descritos como aquellos mecanismos bioquímicos, regulados por un conjunto específico de genes, que permiten a las plantas tolerar el estrés asociado a la

presencia de hielo y el efecto deshidratante del mismo en los tejidos. La tolerancia al congelamiento se logra a través de variadas estrategias, tales como: la modificación en la composición de lípidos de membrana; ajuste osmótico; incremento en los compuestos crioprotectores; incremento de los mecanismos antioxidantes y expresión de proteínas de estrés por frío, entre otros (Hughes & Dunn 1996; Strand et al. 2003; Uemura & Steponkus 1994; Hekneby et al. 2006). Por otra parte, los mecanismos de evasión del congelamiento son aquellos que retrasan y/o evitan la formación y propagación del hielo en los tejidos a través de la disminución del punto de congelamiento o por sobreenfriamiento (Larcher 1982). La producción de solutos (Burke et al. 1976), la presencia de proteínas anticongelantes (Griffith et al. 2005) y propiedades estructurales que inhiben la nucleación y propagación del hielo (Levitt 1980; Wisniewski & Fuller 1999) han sido descritos como mecanismos de evasión. Aunque, en general, los fisiólogos han puesto estas estrategias en dos categorías separadas, ambos mecanismos pueden actuar consecutivamente, de manera interactiva o incluso variar de acuerdo a condiciones ambientales (Sierra-Almeida et al. 2009; Sklenář 2017; Morales et al. 2020a), lo que provoca que la habilidad de las plantas para sobrevivir al congelamiento sea una respuesta bastante compleja e integrada. Por otra parte, y a pesar de que se reconoce que la evasión es un mecanismo adaptativo de resistencia al congelamiento, en los últimos años pocas investigaciones se han dedicado a comprender los mecanismos subyacentes y la regulación de la evasión del congelamiento en comparación con los mecanismos de tolerancia (Wisniewski et al. 2014). Lo anterior, ha dado lugar a una visión sesgada de la biología molecular y la genómica detrás de la resistencia al congelamiento, ignorando el contexto a nivel

de planta completa y su interacción con el medio ambiente (Gusta & Wisniewski 2013).

A nivel de planta completa, la arquitectura de la planta definida como la organización tridimensional del cuerpo de la planta, incluido el patrón de ramificación, así como el tamaño, la forma y la posición de las hojas y los órganos florales (Reinhardt & Kuhlemeier 2002) ha sido descrita como una de las posibles maneras para evitar los efectos de las temperaturas bajo cero (i.e. exclusión espacial; Nobel & Smith 1983). Un claro ejemplo de lo anterior son las plantas de cojín, las que debido a su baja estatura y estructura compacta son eficientes trampas de calor, generando un desacoplamiento térmico entre las hojas y la temperatura del aire de hasta 20°C (Körner 2003). Asimismo, las rosetas gigantes del género *Espeletia* tienen hojas marcescentes que cubren y mantienen la temperatura del tallo por encima de 0°C (Smith 1979; Rada et al. 1985). Además, estas especies tienen un brote apical aislado por capas de hojas en expansión y maduras, que por la noche se doblan hacia adentro a través de movimientos nictinásticos (Smith 1974), lo que protege a estos tejidos sensibles de las bajas temperaturas.

Es importante destacar que la arquitectura de las plantas ha sido descrita como una estrategia eficaz para proteger, no sólo los órganos vegetativos sino también los órganos reproductivos, contra los daños causados por el congelamiento. Por ejemplo, Hacker y colaboradores (2011) al analizar los patrones de congelamiento de 4 plantas alpinas en cojín: *Saxifraga bryoides*, *S. caesia*, *S. moschata* y *Silene acaulis*, descubrieron en todas ellas que, cada brote reproductivo necesitaba un evento de nucleación de hielo independiente para iniciar el congelamiento. Los

autores propusieron que el patrón de congelamiento es consecuencia del gradiente de temperatura que se produce naturalmente dentro de los cojines, que parecía interrumpir la propagación del hielo térmicamente (i.e Barreras Térmicas de Propagación Hielo, BTPH: Fuller & Wisniewski 1998; Körner et al. 2003; Hacker et al. 2011). En estas especies, el sobreenfriamiento es imperativo para hacer frente al congelamiento, debido a que la formación de hielo causa un daño letal en los órganos reproductivos. Asimismo, Morales et al. (2020a), encontró que la arquitectura de las flores afecta significativamente el grado de resistencia al congelamiento de las flores, donde las inflorescencias en capítulo poseen un mayor grado de resistencia al congelamiento comparado con inflorescencias del tipo terminal, espiga y cima. Los autores proponen que el mayor grado de resistencia al congelamiento de los capítulos florales podría ser el resultado de la arquitectura del capítulo, donde numerosas y pequeñas flores espacialmente comprimidas, podrían amortiguar la fluctuación de la temperatura, manteniendo temperaturas estables al interior de la inflorescencia (desacople térmico). Sumado a lo anterior, Davies (2013) propone que la disposición en forma de roseta de las brácteas foliáceas del involucre, que rodean el capítulo en estas especies puede servir como una estrategia morfológica de aislamiento del frío.

Además de las barreras térmicas de propagación de hielo (BTPH), las Barreras Estructurales de Propagación del Hielo (BEPH) han sido descritas como otro mecanismo de evasión que protege las estructuras reproductivas de la intrusión y el daño causado por el hielo (Kuprian et al. 2014). Las BEPH previenen y/o retrasan la propagación del hielo desde el tallo hacia órganos reproductivos (brotes o flores)



permitiendo el sobreenfriamiento y evitando el daño por congelamiento en estos órganos que tienen poca o ninguna tolerancia a la formación de hielo (Workmaster 1999; Carter et al. 2001; Kuprian et al. 2014). Las características de los tejidos de la BEPH incluyen ausencia de tejido vascular maduro y/o ausencia de conexión vascular, células pequeñas empaquetadas con paredes celulares gruesas que están desprovistas de vacuolas y espacios intercelulares, regiones de tejidos seco, reducción en el diámetro de los poros en las membranas de las punteaduras y la presencia de sustancias hidrófobas (Ishikawa & Sakai 1981; Ashworth 1984; Quamme 1978; Quamme 1995; Kuprian et al. 2016). Al respecto, Kuprian y colaboradores (2014) encontraron que la BEPH ubicada en la base del pedicelo (en la unión anatómica de los brotes vegetativos y reproductivos) de *Loiseleuria procumbens* evita la propagación del hielo desde el tallo hacia los brotes reproductivos de ésta y otras especies leñosas durante los meses de verano. La barrera permite que los brotes reproductivos permanezcan sobreenfriados durante una helada nocturna y sobrevivan ilesos a pesar del congelamiento de los tejidos vegetativos (Kuprian et al. 2014).

Algunos autores han planteado que cuán resistentes al congelamiento son las especies y el tipo de mecanismo de resistencia subyacente depende de la estrategia de historia de vida (LHS). Esto se debe a que la inversión energética en funciones como el crecimiento y la reproducción determinadas por la LHS, genera que las plantas tengan menos recursos para asignar a otras funciones como la inversión en mecanismos de resistencia al congelamiento (Sakai & Larcher 1987; Agrawal et al. 2004; Neuner & Beikircher 2010; Wingler 2015; Bucher et al. 2019). Al respecto,

Morales et al. (2020a) encontraron que el grado de resistencia al congelamiento en flores y hojas de especies herbáceas de los Andes de Chile central dependía de la LHS. En particular, el 58% y el 83% de las especies perennes estudiadas resistían temperaturas  $\leq -10$  °C en sus flores y hojas, respectivamente, en comparación con sólo el 30% y el 40% de las especies anuales (Morales et al. 2020a). Al estudiar el tipo de mecanismo de resistencia que subyace estos patrones, los autores encontraron que el principal mecanismo de resistencia al congelamiento en especies anuales, tanto en hojas como en flores, fue la evasión (70%), mientras que en especies perennes ambos mecanismos estaban casi igualmente representados (Morales et al. 2020b). Lo anterior pone de manifiesto dos cosas fundamentales: por un lado, apoya el hecho de que la estrategia de historia de vida puede determinar qué tan resistentes al congelamiento son los tejidos y el tipo de mecanismo que subyace esta respuesta. Por otro lado, demuestra lo particularmente importante que son los mecanismos de evasión para la protección de las estructuras reproductivas tanto en especies anuales como en especies perennes.

Basados en los antecedentes previamente expuestos, en este capítulo exploraremos los mecanismos anatómicos de evasión del congelamiento en estructuras reproductivas de especies anuales y perennes. Específicamente estudiaremos si estas especies poseen barreras estructurales de propagación de hielo (BEPH), ¿qué tan efectivas son? y si ¿existen diferencias en la frecuencia de las BEPH al comparar ambas LHS? A su vez, y dado que la arquitectura de las flores podría ser un rasgo importante que determine la temperatura a la cual se exponen estos órganos durante eventos de heladas (desacople térmico),

exploraremos los patrones de congelamiento por tipo de inflorescencia, con el fin de identificar la presencia de barreras térmicas de propagación de hielo (BTPH). Para ello, compararemos el patrón de congelamiento de 14 especies, 7 especies anuales y 7 especies perennes, con seis tipos diferentes de inflorescencias: capítulo, cima, espiga, espiguilla, terminal y umbela, utilizando la tecnología de análisis térmico de infrarrojos (ATI). Finalmente se discutirá acerca de la importancia de la BEPH y BTPH como mecanismos de evasión al congelamiento y su relación con la habilidad de los tejidos reproductivos de especies anuales y perennes para resistir eventos de heladas durante la temporada de crecimiento en un sistema alpino.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Todos los individuos utilizados en este estudio fueron colectados en sitios ubicados cerca de la localidad de Farellones (Los Andes de Chile central), ubicado a 50 km al este de Santiago, Chile. El clima en esta zona es de tipo alpino con fuerte influencia del clima mediterráneo, el cual predomina en elevaciones más bajas, generando una estación de crecimiento seca (Santibañez & Uribe 1990). La estación de crecimiento comienza con el derretimiento de la nieve en octubre y termina en abril con la primera nevada. Durante este periodo, la temperatura media del aire es de 15,4°C, con un máximo y un mínimo de 32°C y 5°C, respectivamente (Morales et al. 2020b). Los eventos de congelamiento se distribuyen durante toda la estación de crecimiento, sin embargo, existe una mayor frecuencia al inicio y final de la estación de crecimiento, durante los meses de octubre-noviembre y febrero-marzo (Morales et al. 2020b). Existe una gran variación interanual en el número y la intensidad de los episodios de heladas, que oscilan entre 2 y 59 episodios de

heladas por temporada de crecimiento. La duración de estas heladas también es muy variable y oscila entre 1,5 y 13 horas. La temperatura mínima puede descender por debajo de  $-10^{\circ}\text{C}$  en primavera (Morales et al. 2020b).

Se estudiaron un total de 14 especies de hierbas, incluidas 7 especies anuales y 7 perennes (Tabla 1). El material vegetal fue colectado entre los 2200 y 3100 m de altitud. Las especies estudiadas se seleccionaron en base a su abundancia observada en la comunidad herbácea presente en el área. Luego, se consideraron las características morfológicas de los órganos reproductivos (flores/inflorescencias) para evaluar el patrón de congelamiento en 6 tipos de inflorescencias diferentes: capítulo, cima, simple, espiga, espiguilla y umbela. El material vegetal fue colectado entre noviembre de 2018 y marzo de 2019, de acuerdo a la fenología de las especies.



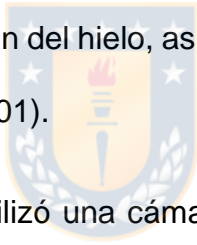
### **Colecta del material vegetal**

Para cada especie, el material vegetal se colectó de 3 individuos seleccionados al azar. Los brotes reproductivos se colectaron durante la antesis (corola abierta y de la flor sexualmente funcional; Neuner et al. 2013). Se colectó 1 brote reproductivo por individuo ( $n$  total = 3 brotes por especie). Un brote reproductivo se refiere a una sola flor o inflorescencia unida a un pedicelo y/o a una porción del pedúnculo, en algunas especies también incluye brácteas tipo-hoja. Los brotes reproductivos se cortaron con una tijera de podar, se pusieron inmediatamente en un contenedor con agua y se cubrieron cuidadosamente con una bolsa de plástico oscura. Los brotes reproductivos fueron transportados dentro de un cooler a la Universidad de

Concepción y se almacenaron en un refrigerador a 4°C. Todas las muestras se utilizaron en los análisis termográficos dentro de los 4 días siguientes a la colecta.

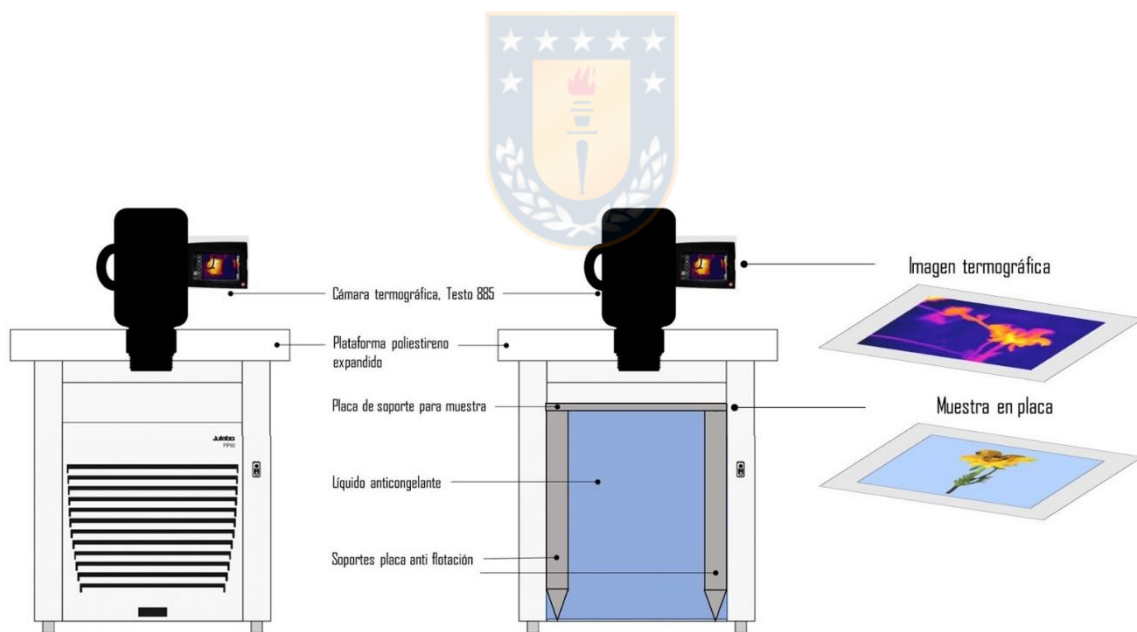
### **Análisis térmico de infrarrojos (ATI)**

Para identificar la presencia de barreras estructurales y térmicas de propagación de hielo (BEPH y BTPH respectivamente) y determinar la importancia de la arquitectura floral en el patrón de congelamiento se utilizó la técnica de análisis térmico de infrarrojos ATI. El uso de ATI para estudiar el proceso de congelamiento se basa en el hecho de que, la nucleación del hielo es un evento exotérmico y la liberación del calor de la fusión (i.e. cambio de fase líquida a sólida del agua) puede ser monitoreada y visualizada. De esta manera, es posible identificar con precisión el lugar donde comienza la nucleación del hielo, así como su propagación a los tejidos circundantes (Wisniewski et al. 2001).



Para realizar el análisis ATI se utilizó una cámara termográfica Testo (Testo 885, Testo INC, Lenzkirch, Alemania). Para identificar el patrón de congelamiento, los brotes reproductivos fueron fijados a una placa de soporte especialmente diseñada (10x10 cm, impermeable a la radiación infrarroja; Fig. 1) utilizando cinta adhesiva de doble cara (1 cm de ancho). La placa de soporte fue puesta dentro del compartimento de refrigeración de un criostato (F34-ME, Julabo Labortechnik GmbH, Alemania), de modo que toda la superficie de esta placa estuviera en contacto con el líquido anticongelante (Polycool Mix -50, PolyScience, Illinois USA). Debido a que las pequeñas muestras de plantas escindidas tienden a sobreenfriarse más que las plantas intactas (Neuner et al. 1997), el proceso de congelamiento fue inducido utilizando un trozo de algodón húmedo en la base del brote. Se utilizó una

plataforma de poliestireno expandido para colocar la cámara termográfica en la superficie del criostato. Esta plataforma contenía un agujero en el centro donde se encontraba la lente de la cámara (Fig. 1). Una vez instalada y fijada la cámara en esta plataforma, se realizó el plano de enfoque de los brotes reproductivos, con el fin de garantizar que la formación de hielo quedase registrada a la mayor resolución posible. Las imágenes infrarrojas se registraron a un intervalo de medición de 3s, con una duración total de 4 horas de registro. El registro visual de ATI se realizó en 3 réplicas por especie. El análisis de las imágenes infrarrojas se realizó con el software IRSoft versión 4.5 (Testo INC., Alemania).



**Fig. 1.** Representación gráfica del montaje del experimento de análisis termográfico.

## Experimento de simulación de heladas

El registro visual ATI se realizó para cada muestra expuesta a una simulación de helada. Cada simulación de heladas en el interior del criostato comenzó a 0°C y terminó a -20°C con una velocidad de enfriamiento de -5°C/hr. La tasa de enfriamiento fue seleccionada de acuerdo a las tasas máximas de enfriamiento durante los eventos de heladas que ocurren durante la estación de crecimiento en los Andes de Chile central, obtenidas de registros previos de estaciones meteorológicas ubicadas a 1,5 metros sobre el suelo (Tabla 1 del Capítulo 1).

A través del ATI se obtuvieron los siguientes parámetros:

1. Se identificó el tejido en el cual ocurre inicialmente la formación de hielo.
2. Se identificaron la temperatura de nucleación del hielo (INT, °C) y el tiempo (min) transcurrido desde el inicio del experimento de simulación de heladas hasta que ocurrió la nucleación del hielo en cada tejido del brote reproductivo (Pedúnculos, hojas, pedicelos, brácteas, flores liguladas, flores tubulares, y estructuras florales específicas como pétalos, anteras, filamentos y aristas).
3. Se calculó el desfase temporal (min) entre la formación del hielo en los pedúnculos y flores.
4. Se calcularon las tasas de descenso de temperatura por hora en cada tejido del brote reproductivo.
5. Se identificó la presencia de barreras estructurales de propagación de hielo (BEPH): cuando el hielo se propagaba a lo largo del pedúnculo (de abajo hacia arriba), sin embargo, al llegar a la base de la flor éste se detuvo y por lo tanto no se registró la intrusión de hielo en la misma. Para la cuantificación de la funcionalidad de las BEPH, se comparó la INT de las flores y

pedúnculos. Las BEPH fueron efectivas cuando la INT del pedúnculo fue mayor que la INT de las flores (Kuprian et al. 2014).

6. Se identificó la presencia de barreras térmicas de propagación de hielo (BTPH): cuando la temperatura de las flores y/o inflorescencias era superior a la temperatura de los órganos adyacentes y la placa de soporte (desacople térmico).

### **Análisis estadístico**

Para evaluar las diferencias en la proporción de especies anuales y perennes con BEPH, se realizó una prueba de probabilidad exacta de Fisher. Para determinar la efectividad de las BEPH, se comparó la INT de las flores y pedúnculos a través de una prueba *t de Student* para cada especie. Para determinar las diferencias en el delta temporal en que ocurre la INT en flores y pedúnculos se utilizó una prueba *t de Student* para especies anuales y perennes. Para determinar si existían diferencias en la temperatura alcanzada al final de la secuencia de video entre los 6 tipos de inflorescencias (capítulo, cima, espiga, espiguilla, terminal y umbela) se realizó una ANOVA de una vía y la prueba post hoc Tukey ( $p < 0,05$ ). La normalidad y homogeneidad de la varianza fueron evaluadas a través de las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Todos los análisis estadísticos se realizaron en RStudio (Versión 1.1.463-© 2009-2018 RStudio, Inc.).



## RESULTADOS

La mayoría de las especies estudiadas siguieron un patrón general de propagación de hielo en los brotes reproductivos, que fue independiente de su estrategia de historia de vida (LHS). En el 72% de las especies estudiadas, el hielo se formó en el tallo o pedúnculo, a una temperatura promedio de  $-6,2^{\circ}\text{C} \pm 0,2 \text{ EE}$  y a los  $65 \text{ min} \pm 2,2 \text{ EE}$  de iniciado el experimento de simulación de heladas. Una vez formado el hielo, éste se propagó sin barreras por el tejido vascular hacia el pedicelo e inflorescencia. Para las especies *Alstroemeria exerens* y *Hordeum comosum* no se pudo determinar si la nucleación del hielo se inició desde los pedúnculos, dado que el tamaño de las inflorescencias impedía incluirlos en el plano de enfoque. En el caso de especies que presentaron hojas o brácteas en el tallo o pedúnculo, i.e. *Phacelia brachyantha*, *Scyphanthus elegans*, *Alstroemeria exerens*, *Collomia biflora*, *Quinchamalium parviflorum* y *Lupinus microcarpus*, éstas se congelaron simultáneamente con la formación de hielo en el tejido vascular a la cual estaban conectadas (INT hojas  $-6,6^{\circ}\text{C} \pm 0,3 \text{ EE}$ ), exceptuando *Phacelia secunda*, en la cual se observó un desfase temporal de 12 min entre la formación de hielo en el tejido vascular y hojas. Una vez que la propagación del hielo alcanzó las inflorescencias y/o flores individuales, el patrón de propagación de hielo fue muy variado y dependiente de la especie y/o tipo de inflorescencia (ver anexo 1 para la descripción detallada del patrón de congelamiento por especie, Figs. 2-7). En la mayoría de las especies estudiadas el hielo no se propagó inmediatamente desde el pedúnculo hacia la inflorescencia, con un tiempo promedio de desfase de 53 min. El desfase temporal fue el resultado de las diferencias en la INT entre tejidos (INT tallos = -

6,2°C ± 0,2 EE; INT flores = -7,6°C ± 0,4 EE;  $p < 0,005$ ) y/o a la presencia de barreras estructurales de propagación de hielo, BEPH (86% y 57% de especies anuales y perennes respectivamente) y barreras térmicas de propagación de hielo, BTPH (en inflorescencias tipo capítulo, cima (sólo *P. brachyantha* y *P. secunda*) y umbela). La termografía de las especies mostró que, independiente de la presencia o ausencia de BEPH y BTPH, el congelamiento de las inflorescencias sigue un patrón común, en el cual se observaron eventos de nucleación independientes para cada flor dentro de la inflorescencia. Estos eventos de nucleación pueden ocurrir en secuencia (Fig. 5; *H. comosum*), o separados por varios minutos (Fig. 7; *P. coriacea* y *S. graveolens*). Asimismo, en las inflorescencias de mayor tamaño, como *A. exerens* y *S. elegans*, el congelamiento entre pétalos parece ser igualmente independiente (Figs. 7 y 3).

### **Barreras estructurales de propagación de hielo (BEPH)**

En especies anuales la temperatura de nucleación de hielo (INT) ocurrió a los -6,0°C ± 0,3 EE y -6,7°C ± 0,5 EE, en pedúnculos y flores respectivamente (Fig. 8). En pedúnculos, la INT varió desde -5,1°C en *Collomia biflora* hasta los -7,0°C en *Quinchamalium parviflorum* (*Cb* y *Qp* en Fig. 9). En flores, el rango de INT varió entre -3,9°C en *Chaetanthera flabellata* y -7,6°C en *C. biflora* (*Cf* y *Cb* en Fig. 9). Al evaluar los patrones de congelamiento de los brotes reproductivos se determinó que, de las 7 especies anuales estudiadas, 6 de ellas presentaban BEPH, exceptuando *Scyphanthus elegans*. En estas especies, se observó que existe una barrera ubicada en la base de la inflorescencia, que impidió la intrusión de hielo en las mismas. La nucleación del hielo en las flores de estas especies ocurrió desde 4

(*Lupinus microcarpus*, *Lm*; Fig 11) hasta 42 min después de la nucleación del hielo en el pedúnculo (*C. biflora*, *Cb*; Fig 11). Este delta temporal entre ambos eventos de nucleación pudo ser incluso mayor si se considera que en la especie *Q. parviflorum* no se registraron eventos de nucleación en las flores a lo largo del experimento de simulación de heladas (3h 40 min, *Qp*; Fig. 9). Respecto a la efectividad de las BEPH, se determinó que sólo dos de las especies anuales estudiadas presentaban BEPH efectivas, es decir, la INT de la flor fue significativamente más negativa que la INT del pedúnculo. Estas especies fueron: *C. biflora* (delta INT flor-pedúnculo: 2,5K;  $t(6) = 3,05$ ;  $p < 0,05$ ) y *L. microcarpus* (delta INT flor-pedúnculo: 1,5K;  $t(5) = 3,2$ ;  $p < 0,05$ ). Sin embargo, en dos especies no fue posible determinar la efectividad. En *Phacelia brachyantha* no se obtuvo suficiente replicación y en *Q. parviflorum* no se registraron eventos de nucleación en flores individuales.

En especies perennes la INT ocurrió a los  $-6,9^{\circ}\text{C} \pm 0,4$  EE y  $-8,8^{\circ}\text{C} \pm 0,6$  EE, en pedúnculos y flores respectivamente (Fig. 8). En pedúnculos la INT ocurrió desde los  $-5,1^{\circ}\text{C}$  en *Phacelia secunda* hasta los  $-8,0^{\circ}\text{C}$  en *Pozoa coriacea* (*Ps* y *Pco*; Fig. 10). En flores la INT ocurrió desde los  $-5,0^{\circ}\text{C}$  en *Stachys philippiana* hasta los  $-11,4^{\circ}\text{C}$  en *Perezia carthamoides* (*Sp* y *Pc*; Fig. 10). Al evaluar los patrones de congelamiento de los brotes reproductivos se determinó que, 3 de las 7 especies perennes estudiadas presentaban BEPH: *S. philippianna* (*Sp*), *P. coriacea* (*Pco*) y *P. secunda* (*Ps*) (Fig. 10). No fue posible determinar la presencia BEPH en *Alstroemeria exerens*, *Hordeum comosum* y *P. carthamoides*, por dificultades para observar el patrón de congelamiento desde pedúnculos a flores, y/o determinar la

INT en alguno de estos dos tejidos. En la especie *Sanicula graveolens*, el hielo se propagó directamente desde el pedúnculo hacia la inflorescencia sin detectar la presencia de BEPH (*S. graveolens* Fig. 7c-e). En aquellas especies que presentaron BEPH, la nucleación del hielo en las flores ocurrió desde 26 (*S. philipianna*, *Sp*; Fig 11) hasta 161 min después de la nucleación del hielo en el pedúnculo (*P. coriacea*, *Pco*; Fig.11). Respecto a la efectividad de las BEPH, se determinó que sólo una de las especies perennes estudiadas presentaba BEPH efectivas. En *P. coriacea* la INT fue 3,1K más negativa que la INT del pedúnculo ( $t(8) = 2,5; p = 0,04$ ).

A pesar de que la presencia de las BEPH tendió a ser mayor en especies anuales que en especies perennes, no existieron diferencias significativas en la proporción de especies anuales y perennes con BEPH ( $X^2 = 0,35; gl = 1; p = 0,55$ ), ni en la proporción de especies anuales y perennes con BEPH efectivas ( $X^2 = 0; gl = 1; p = 1$ ).



### **Barreras térmicas de propagación de hielo (BTPH)**

Los patrones de congelamiento evidenciaron que, independiente de la LHS, existió desacople térmico en las flores de algunas especies, las cuales permanecieron más tiempo a mayores temperaturas que los pedúnculos y/o hojas del mismo brote reproductivo. El desacople térmico provocó que, tanto en especies anuales como perennes, existieran diferencias significativas entre el tiempo en que ocurren la nucleación del hielo en el pedúnculo y en las flores (promedio general 58 min;  $p \leq 0,005$ ). El desacople térmico se relacionó con la organización arquitectónica de las inflorescencias (tipo de inflorescencia), y/o a las particularidades morfológicas de las mismas (e.g. presencia de tricomas,), las que determinaron la temperatura a la

cual las flores fueron expuestas y no a diferencias en la tasa de enfriamiento de los tejidos (relación entre la disminución de la temperatura y el tiempo, °C/hr; Tabla A1).

En especies anuales, la nucleación de hielo en pedúnculos ocurrió a los 65 min  $\pm$  2 EE, mientras que la nucleación en flores ocurrió a los 92 min  $\pm$  8 EE (Fig. 8). El delta de tiempo promedio entre la nucleación en pedúnculos y flores fue de 26 min. Este delta comprende un amplio rango, por ejemplo, en las especies *Scyphanthus elegans* y *Lupinus microcarpus* la nucleación en las flores ocurrió a 1,3 y 4 min después de que ocurre la nucleación en el pedúnculo, respectivamente (Fig. 11). En contraste, en las especies *Collomia biflora* y *Chaetanthera flabellata* la nucleación en flores ocurrió 31 y 42 min después del inicio de la formación de hielo en el pedúnculo (Fig. 11). El delta temporal en especies anuales ocurrió a pesar de no encontrar diferencias significativas en la temperatura de nucleación de hielo (INT) entre pedúnculos y flores (INTs:  $-6,0^{\circ}\text{C} \pm 0,3$  EE y  $-6,7^{\circ}\text{C} \pm 0,5$  EE en pedúnculos y flores respectivamente; Fig. 8). Este fenómeno refleja claramente que las flores tardaron más en alcanzar menores temperaturas que los pedúnculos, produciéndose el desacople térmico entre estos dos tejidos. Es necesario aclarar que, en las especies anuales *C. biflora* y *L. microcarpus* la INT de las flores fue más negativa que la INT de los pedúnculos (*Cb* y *Lm*; Fig. 9), por lo cual el desfase temporal en la nucleación se debe en gran medida a la tasa de enfriamiento experimental. Por el contrario, en las especies del género *Chaetanthera*, a pesar de que la INT en flores tubulares fue más positiva que la INT del pedúnculo (1,9 K), la nucleación de las flores ocurrió en promedio 31 min después de la nucleación de los pedúnculos, consecuencia del desacople térmico mayor (Fig. 12). La

organización de las flores en el capítulo, las cuales se encuentran espacialmente comprimidas y protegidas por brácteas de involucre, provocó que las flores tubulares ubicadas en el centro de la inflorescencia permanecieran a mayores temperaturas retrasando su nucleación (Fig. 2; *C. flabellata* y *C. linearis*). Asimismo, en la especie *P. brachyantha*, la nucleación del hielo ocurrió más de 60 min después de la nucleación del hielo en el pedicelo (Fig. 9), consecuencia del desacople térmico relacionado a la presencia de abundantes tricomas en la inflorescencia y la disposición de las flores en las inflorescencias tipo “cuncuna” (Fig. 3. *P. brachyantha*).

En especies perennes la nucleación de hielo en pedúnculos ocurrió a los 62 min  $\pm$  2,9 EE, mientras que la nucleación en flores ocurrió a los 133 min  $\pm$  12 EE (Fig. 8). El delta de tiempo promedio que ocurre entre la nucleación en pedúnculos y flores en especies perennes fue de 91 min. Este delta de tiempo abarcó un rango amplio, desde 27 min en *Stachys philippiana* (*Sp*; Fig. 10), a 63 min en *Sanicula graveolens* (*Sg*; Fig. 10). Incluso en *Pozoa coriacea*, este desfase de la nucleación entre flores y pedúnculos alcanzó los 161 min (*Pco*; Fig. 10). En especies perennes, parte de este desfase temporal se debe a las diferencias entre la INT entre pedúnculos y flores ( $p < 0,05$ ; INTs:  $-6,9^{\circ}\text{C} \pm 0,4$  EE y  $-8,8^{\circ}\text{C} \pm 0,6$  EE, en pedúnculos y flores respectivamente; Fig. 8). Sin embargo, a nivel de especie sólo existieron diferencias significativas entre INTs de pedúnculos y flores en *S. graveolens* y *P. coriacea* (*Sg* y *Pco*; Fig. 10), por lo que parte de este delta temporal se debe a estas diferencias (3K, *Sg* y *Pco*; Fig. 10). En ambas especies este delta temporal fue mayor a lo

esperado experimentalmente, lo que revela que existe adicionalmente desacople térmico en la inflorescencia tipo umbela (Figs. 7 y 12).

Como otra manera de comprobar la importancia de la organización arquitectónica en el desacople térmico de las inflorescencias, se compararon las temperaturas que alcanzaron los distintos tipos de inflorescencias durante la mitad del experimento de simulación de heladas ( $-10^{\circ}\text{C}$ , 1h 50 min). Los resultados arrojaron que existieron diferencias significativas entre los distintos tipos de inflorescencias ( $F=14,6$ ;  $p<0,001$ ; Fig. 12). Específicamente, los capítulos florales son los que tuvieron mayores temperaturas ( $-3,9^{\circ}\text{C} \pm 0,7$  EE; Fig. 12; Fig. A1), indicando un desacople térmico mayor respecto a la placa (temperatura experimental o de base). En contraste, las inflorescencias del tipo espiguilla, las cuales tiene una forma más aplanada y alargada, alcanzaron las menores temperaturas ( $-9,7^{\circ}\text{C} \pm 0,3$  EE; Fig.12) y el desacople térmico con respecto a la placa fue nulo (Fig. A4).

### **Relación entre BEPH/BTPH y la resistencia al congelamiento de plantas anuales y perennes**

Las especies fueron agrupadas en 3 diferentes categorías en base a una estrategia común de resistencia al congelamiento (Fig.13). Esta estrategia común fue determinada por la integración de mecanismos fisiológicos y estructurales de resistencia al congelamiento y el grado de resistencia al congelamiento de las flores: (1) INT de flores, (2) tipo de mecanismo de resistencia al congelamiento en flores (evasión o tolerancia), (3) presencia de BEPH y BTPH y (4) resistencia de las flores al congelamiento ( $LT_{50}$ ) (Fig. 13).

**Especies tolerantes con BEPH y/o BTPH:** Esta categoría la integran las especies anuales: *C. flabellata* y *C. linearis* y las especies perennes: *H. comosum*, *P. carthamoides*, *P. secunda*, *P. coriacea* y *S. philippiana* (Fig. 13). En estas especies existió un delta temporal entre la formación del hielo en los pedúnculos y las flores (Figs. 9 y 10). Este delta temporal fue consecuencia de la presencia de BEPH y/o BTPH, y en menor medida a diferencias entre el INT de pedúnculos y flores (*P. secunda* y *P. coriacea*). Adicionalmente, la comparación de los valores de INT con la temperatura de daño ( $LT_{50}$ ) de flores arrojó que estas especies toleran la formación de hielo en sus flores (Tabla 2). Por lo tanto, estas especies utilizan una estrategia mixta de resistencia al congelamiento. En primera instancia, la presencia de BEPH impidió la propagación del hielo desde el pedúnculo a las flores (exceptuando *P. carthamoides*); en segunda instancia el desacople térmico (BTPH) retrasó el momento en que las flores tubulares alcanzaron su INT (exceptuando *H. comosum* y *S. philippiana*); finalmente y si estas barreras son superadas (e.g. en un evento de helada intenso y prolongado), serían los mecanismos de tolerancia al congelamiento que actúan para proteger las flores.

**Especies evasoras con BEPH y/o BTPH:** Esta categoría la integran las especies anuales: *C. biflora*, *L. microcarpus*, *Q. parviflorum*, *P. brachyantha* y la especie perenne *S. graveolens* (Fig. 13). En estas especies existió un delta temporal entre la formación del hielo en los pedúnculos y las flores (Figs. 9 y 10). Este delta temporal fue consecuencia de la presencia de BEPH y/o BTPH, y a diferencias entre el INT de pedúnculos y flores (exceptuando *Q. parviflorum* donde no se registró INT de flores). Es importante destacar que en *L. microcarpus* el delta temporal de 4 min



fue calculado en base al primer evento de nucleación registrado. Sin embargo, y tal como se observa en las imágenes termográficas (Fig. 4), la presencia de BEPH permitió el congelamiento independiente de cada una de las flores del brote reproductivo, proceso que se extiende más allá de 25 min (Fig. 4). La presencia de BEPH y/o BTPH en estas especies es un mecanismo fundamental ya que no existieron diferencias entre la INT de las flores y su  $TL_{50}$  (Tabla 2), por lo tanto, la resistencia al congelamiento de las flores en estas especies depende en su totalidad de estas estrategias de evasión.

**Especies evasoras sin BEPH ni BTPH:** Esta categoría la integran la especie anual *Scyphanthus elegans* y la especie perenne *A. exerens* (Fig. 13). En *S. elegans*, la formación de hielo en las flores ocurrió casi simultáneamente a la formación de hielo en los pedúnculos (delta: 1 min; Fig. 9 y Fig.11), sin registrar la presencia de BEPH que impidiesen la propagación del hielo desde el pedúnculo la flor. En *A. exerens* no se pudo determinar si la formación del hielo ocurrió desde el pedúnculo. No obstante, y dado que no existieron diferencias en la INT de flores y hojas (y según el patrón general observado, hojas y pedúnculos se congelan simultáneamente), es posible deducir que esta especie tampoco posee BEPH entre el pedúnculo y la flor. En ambas especies tampoco se registró la presencia de BTPH. Sin embargo, en *A. exerens*, tanto pétalos como estambres se congelaron de manera independiente, lo que sugiere que estas estructuras no están conectadas vascularmente entre sí, por lo cual se necesitan eventos de nucleación independientes para que la flor completa se congele. En ambas especies no existieron diferencias entre el INT y la  $LT_{50}$  de

las flores, por lo tanto, estas especies no toleran la formación de hielo en sus flores (Tabla 2).

## DISCUSIÓN

Los patrones de congelamiento en los brotes reproductivos de 14 especies de hierbas anuales y perennes de los Andes de Chile central fueron estudiados mediante termografía de infrarrojos. Estos patrones de congelamiento revelaron que, tanto especies anuales como perennes presentaron BEPH y/o BTPH que retrasaron la intrusión del hielo en las flores. La presencia de BEPH fue un rasgo común, especialmente en especies anuales, en donde el 86% de especies presentaron BEPH, mientras que en especies perennes esta proporción fue de un 57%. Asimismo, los resultados mostraron que la arquitectura y/o la morfología de las inflorescencias es un rasgo importante al determinar la presencia de BTPH. Entre los tipos de inflorescencias analizados, fueron los capítulos, umbelas y cima (exceptuando *S. elegans*) los que tuvieron un desacople térmico mayor con el resto de los tejidos y, por lo tanto, un desfase temporal mayor entre la formación de hielo en los pedúnculos y las flores. La presencia de BEPH y/o BTPH fue independiente del tipo de LHS, ya que tanto especies anuales y perennes presentaron ambos mecanismos. Sin embargo, la relevancia de estos mecanismos sí varió según la LHS. En las especies anuales estudiadas, BEPH y BTPH fueron mecanismos fundamentales y vitales para evitar el daño por congelamiento de flores, ya que éstas en su mayoría no toleraron la formación de hielo. En especies perennes estos mecanismos fueron menos fundamentales, ya que la mayoría de las especies si

toleraron la formación del hielo en sus flores. Sin embargo, la combinación de mecanismos de evasión y tolerancia les confirió a las especies perennes un mayor grado de resistencia al congelamiento.

### **BEPH y BTPH: mecanismos complementarios de evasión del congelamiento**

Los patrones de congelamiento en los brotes reproductivos de las especies estudiadas revelaron que el hielo se formó en el tallo o pedúnculo y se propagó sin barreras hacia el pedicelo e inflorescencia. Este patrón de congelamiento coincide con lo reportado en otras especies, donde la propagación del hielo en el tallo comienza inmediatamente después de la nucleación del hielo, evidenciando que el hielo se propaga fácilmente a través de los elementos conductores del tejido vascular (Levitt 1980, Ball et al. 2002, Hacker y Neuner 2007, 2008, Hacker et al. 2008). A pesar de que el hielo se propagó libremente a través del tallo o pedúnculo, la presencia de BEPH en especies anuales como en perennes, evitó y/o retrasó la intrusión del hielo en las inflorescencias. Lo anterior demuestra que las BEPH no son sólo un mecanismo de evasión que protege brotes reproductivos de plantas leñosas durante periodos de latencia o pre-floración (Ishikawa y Sakai 1981, Ashworth et al. 1985, Ishikawa y Sakai 1985, Ashworth et al. 1992, Stone et al. 1993, George et al. 1982, Workmaster 1999), sino también es un mecanismo de evasión presente durante el periodo de antesis tanto en especies leñosas como en especies herbáceas (Carter et al. 1999, 2001, Kuprian et al. 2014, Wisniewski et al. 2014). La presencia de BEPH puede ser fundamental para hacer frente a los eventos de heladas estivales, especialmente, en aquellas especies que no presentan otro tipo de mecanismos de evasión y no toleran la formación del hielo en sus tejidos, como

lo son las especies anuales *C. biflora*, *L. microcarpus* y *Q. parviflorum*. En estas especies, el grado de resistencia al congelamiento de sus flores dependió totalmente de esta estrategia de evasión.

Es importante destacar que la presencia de BEPH no asegura por si sola la protección de las flores contra el daño por congelamiento, ya que en la mayoría de las especies estas barreras no fueron efectivas (INT flores = INT de pedúnculos). Esto significa que, a pesar de que las BEPH impidan la propagación directa del hielo hacia las flores a través del tejido vascular, si las flores alcanzan su INT estas se congelarán de igual manera. En este sentido, la efectividad de las BEPH depende de la combinación con otros mecanismos de evasión que impidan que las flores alcancen su temperatura de nucleación, en particular, del desacople térmico. De esta manera, las BEPH impiden la propagación del hielo hacia las inflorescencias, y el desacople térmico impide que las flores alcancen su INT. Lo anterior genera un delta temporal que, en algunas especies es suficiente para evadir el congelamiento causado por un evento de helada durante la temporada de crecimiento. Al respecto, tanto en especies anuales como perennes, existieron diferencias significativas entre el tiempo en que ocurrió la nucleación del hielo en el pedúnculo y en las flores. Estas diferencias temporales se debieron, en menor medida, a diferencias en la INT de los tejidos, y en mayor medida a la organización arquitectónica de las inflorescencias (tipo de inflorescencia), y/o a las particularidades morfológicas de las mismas (e.g. presencia de tricomas). Así, las especies con inflorescencias del tipo capítulo, cima y umbela presentaron un desacople térmico mayor y por ende un mayor desfase temporal entre la nucleación del hielo en pedúnculos y flores que

aquellas especies con inflorescencias de tipo espiga, espiguilla y terminal. Estos resultados coinciden con lo ya reportado por otros autores, quienes han demostrado que la arquitectura y morfología de las inflorescencias en plantas alpinas y subantárticas puede determinar las condiciones térmicas a la cual se ven expuestos estos órganos reproductivos (Körner 2003, Fabbro y Körner 2004, Yang et al. 2008, Yang y Sun 2009, Hacker et al. 2011, Dietrich y Körner 2014, Little et al. 2016, León-García y Lasso 2019).

Específicamente, la organización de las inflorescencias del tipo capítulo, como las presentes en las especies *C. flabellata*, *C. linearis* y *P. carthamoides*, donde numerosas y pequeñas flores están espacialmente comprimidas y rodeadas por brácteas de involucre, propició el desacople térmico de las flores. Lo anterior se vio reflejado en el desfase temporal entre la formación del hielo en los pedúnculos y las flores tubulares. Este resultado coincide con lo reportado por Little et al. (2016), quienes al estudiar los patrones térmicos de las inflorescencias en 6 mega hierbas subantárticas, encontraron que la especie con mayor desacople térmico en sus inflorescencias fue *Pleurophyllum speciosum*. En esta especie, sus capítulos florales alcanzaron temperaturas 11°C más altas que la temperatura ambiente. Entre otros factores, los autores atribuyeron el desacople térmico a la organización de las flores, las cuales se encontraban densamente empaquetados en el capítulo. Asimismo, Dietrich y Körner (2014) reportaron que, durante el día, el punto de mayor temperatura en las flores de especies de Asteráceas estaba situado casi en el centro del capítulo y disminuía hacia el margen. Lo anterior, explicaría por qué las flores liguladas, situadas al margen de la inflorescencia son las primeras en congelarse, y

no las flores tubulares ubicadas en el centro de la inflorescencia. Sin embargo, y en contraposición a lo planteado por Dietrich y Körner (2014), donde observaron que luego de un sombreado abrupto las temperaturas florales vuelven a la temperatura del aire en pocos minutos, nuestros resultados mostraron que el desacople térmico de los capítulos florales puede ocurrir incluso en ausencia de una fuente de calor directa, durante el curso de un evento de helada. Adicionalmente, algunos autores han planteado que la presencia brácteas foliáceas de involucre que rodean a los capítulos florales es una estrategia morfológica de aislamiento del frío (Körner 2003, Fabbro y Körner 2004, Yang y Sun 2009, Davies 2013), lo que podría haber sido otro de los factores que contribuyeron al desacople térmico de los capítulos en *C. linearis*, *C. flabellata* y *P. carthamoides*. Un efecto de aislamiento térmico similar fue lo observado en las especies *S. graveolens* y *P. coriacea*, donde la organización de las flores en umbelas empaquetadas podría ser la causa del desacople térmico con los demás tejidos del brote reproductivo. Adicionalmente, el gradiente de temperatura natural dentro de la umbela interrumpió térmicamente la propagación del hielo (BTPH), lo que explica el patrón de congelamiento independiente de las flores en las umbelas. Este patrón es similar al patrón de congelamiento observado en plantas en cojín (Hacker et al. 2011). Finalmente, en las inflorescencias del tipo cima de las especies *P. brachyantha* y *P. secunda* se registró desacople térmico en las flores, lo que provocó que el congelamiento en las flores ocurriese >60 minutos después de que ocurrió el congelamiento del pedicelo. Este patrón podría estar asociado a la morfología de las inflorescencias las cuales presentan abundantes tricomas entremedio de los cuales van insertas las flores (dando un aspecto similar a una cuncuna). Al respecto, la presencia de inflorescencias pubescentes ha sido

descrita como una estrategia que permite amortiguar rápidas fluctuaciones de temperatura, ralentizar el enfriamiento nocturno y reducir el riesgo de congelamiento radiativo en plantas alpinas (Krog 1955, Miller 1986, Tsukaya y Tsuge, 2001, Yang et al. 2008), permitiendo el desacople térmico de las inflorescencias y en consecuencia el retraso en la formación del hielo en las mismas.

Los patrones de congelamiento en las inflorescencias del tipo capítulo, umbela y cima descritos anteriormente, ponen de manifiesto cómo la arquitectura y la morfología de la planta pueden jugar un papel importante en la capacidad de acumulación y retención de calor de las inflorescencias y por ende pueden determinar el grado en que estos órganos reproductivos están sujetos a las condiciones térmicas del ambiente (van der kooi et al. 2019). Lo anterior evidencia que la determinación de los patrones de congelamiento y sus posibles causas asociadas a la arquitectura y morfología de las inflorescencias son necesarios para entender de manera más acuciosa cómo ocurre el fenómeno de nucleación y propagación de hielo en campo. A su vez, permite sopesar la importancia de los distintos mecanismos de resistencia al congelamiento, obteniendo una visión más realista e integrada del fenómeno

### **Relación entre BEPH/BTPH y la resistencia de estructuras reproductivas al congelamiento**

A pesar de que la presencia de BEPH y/o BTPH no tuvo una relación directa con la resistencia al congelamiento de las flores (dado que la determinación del  $LT_{50}$  se realizó en tejido extirpado y no en el brote reproductivo completo), comparar el patrón de congelamiento del brote reproductivo, el grado de resistencia al

congelamiento de las flores, y el tipo de mecanismo de resistencia subyacente permitió obtener una visión integrada de la estrategia de resistencia al congelamiento a nivel de brote reproductivo completo. De esta manera fue posible entender qué tan relevantes o vitales fueron ciertos mecanismos de resistencia sobre otros en especies anuales y perennes. Este análisis integrativo mostró que existen 3 estrategias diferentes de estrategias de resistencia al congelamiento: (1) Especies evasoras con BEPH y/o BTPH, (2) especies tolerantes con BEPH y/o BTPH y (3) especies evasoras sin BEPH y/o BTPH.

La estrategia (1) está fue observada mayoritariamente en especies anuales (exceptuando *C. flabellata* y *C. linearis*). Estas especies no toleraron la formación del hielo en sus flores, es decir, una vez ocurrió la nucleación del hielo en el tejido floral este se dañó. Por lo tanto, estas especies evasoras dependieron exclusivamente de BEPH y/o BTPH, mecanismos que retrasaron y/o impidieron la propagación del hielo hacia las estructuras florales. Sorprendentemente, la presencia de estos mecanismos de evasión estructural no fue exclusivo sólo a especies evasoras del congelamiento en sus flores, sino que también estuvieron presentes en especies tolerantes a la formación del hielo en sus flores, como la mayoría de las especies perennes estudiadas (exceptuando *S. graveolens* y *A. exerens*), e incluyeron a las especies anuales *C. flabellata* y *C. linearis*. Por lo tanto, estas especies utilizaron estrategias mixtas de resistencia al congelamiento (estrategia de resistencia 2). La presencia de mecanismos de evasión en especies tolerantes como estrategia complementaria de resistencia podría llegar a ser crucial, especialmente en aquellas especies que poseen un menor margen de seguridad



(LT<sub>50</sub>-INT), como es el caso de *S. philippiana*. Adicionalmente en aquellas especies que poseen un mayor margen de seguridad, podría ser un mecanismo complementario que les permitiría incrementar su grado de resistencia al congelamiento. Lo anterior podría ser uno de los factores que determina su amplio rango de distribución altitudinal en las especies *H. comosum*, *P. carthamoides*, *P. coriacea*, *P. secunda* y *S. philippiana* (límite superior de distribución altitudinal: 3720 m). Cabe destacar que tanto en las especies anuales como en perennes existieron especies evasoras en las que no se detectaron BEPH ni BTPH: *S. elengans* y *A. exerens* (estrategia 3). Posiblemente estas especies dependan fundamentalmente de estrategias de escape temporal, es decir que la fenología de la floración ocurra en periodos de la estación de crecimiento en los cuales los eventos de heladas sean menores (peak de floración en el área de estudio: *S. elegans*: 28 de diciembre; *A. exerens*: 28 de enero). En estas especies la falta de estrategias efectivas de resistencia al congelamiento podría ser uno de los factores que les impidan establecerse a mayores altitudes (límite superior de distribución altitudinal 2100 m).

En resumen, las barreras estructurales y térmicas de propagación de hielo (BEPH y BTPH) son mecanismos de evasión efectivos que permiten evitar el daño causado por eventos de heladas de corta duración y baja intensidad durante la temporada de crecimiento (Sakai y Larcher 1987, Larcher 2003). En especies anuales, las que son principalmente evasoras, estas estrategias estructurales de evasión juegan un rol fundamental en la habilidad de sus tejidos reproductivos para sobrevivir a eventos de heladas. En la mayoría de las especies anuales si no existiese este retraso en la formación y/o propagación del hielo, las flores se dañarían apenas el

hielo se formase. Por el contrario, en especies perennes, las cuales son principalmente tolerantes, la contribución de los mecanismos estructurales de evasión a la resistencia al congelamiento puede ser menor. Sin embargo, podría llegar a ser crucial como un mecanismo complementario, especialmente en aquellas especies que poseen un menor margen de seguridad con respecto a los eventos de heladas extremas que ocurren en la montaña. En la mayoría de las especies perennes la combinación de mecanismos de evasión y tolerancia les confiere un mayor grado de resistencia a los eventos de heladas durante la estación de crecimiento, lo que podría ser uno de los factores que explican su dominancia en estos sistemas.



## REFERENCIAS

- Agrawal AA, Conner JK, Stinchcombe JR (2004) Evolution of plant resistance and tolerance to frost damage. *Ecol Lett* 7:1199–1208
- Ashworth EN, Davis GA (1984) Ice nucleation within peach trees. *J Am Soc Hort Sci* 109 (2): 198–201
- Ashworth EN, Davis GA, Anderson JA (1985) Factors affecting ice nucleation in plant tissues. *Plant Physiol* 79(4): 1033-1037
- Ashworth EN, Willard TJ, Malone SR (1992) The relationship between vascular differentiation and the distribution of ice within *Forsythia* flower buds. *Plant, Cell & Environ* 15(5): 607-612
- Bokhorst S, Bjerke JW, Bowles FW, Melillo J, Callaghan TV, Phoenix GK (2008) Impacts of extreme winter warming in the sub-Arctic: growing season responses of dwarf shrub heathland. *Glob Chang Biol* 14:2603–2612
- Bucher SF, Feiler R, Buchner O, Neuner G, Rosbakh S, Leiterer M, Römermann C (2019) Temporal and spatial trade-offs between resistance and performance traits in herbaceous plant species. *Environ Exp Bot* 157:187–196
- Burke MJ, Gusta LV, Quamme HA, Weiser CJ, Li PH (1976) Freezing and injury in plants. *Annual Review of Plant Physiol* 27: 507–528.
- CaraDonna PJ, Bain JA (2016) Frost sensitivity of leaves and flowers of subalpine plants is related to tissue type and phenology. *J Ecol* 104:55–64
- Carter J, Brennan R, Wisniewski M (1999) Low-temperature tolerance of black currant flowers. *Hort Sci* 34 (5): 855–859.
- Carter J, Brennan R, Wisniewski M (2001) Patterns of ice formation and movement in black currant. *Hort Sci* 36 (6): 855–859
- Davies AM (2013) Hairy Anthers & Mountain Stars: the speciation of Andean Asteraceae in response to geological and climate change. *Arch Sci* 66:69–84
- Dietrich L, Körner C (2014) Thermal imaging reveals massive heat accumulation in flowers across a broad spectrum of alpine taxa. *Alp Bot* 124: 27–35
- Fabbro T, Körner C (2004). Altitudinal differences in flower traits and reproductive allocation. *Flora* 199(1): 70-81
- Fuller MP, Wisniewski M (1998) The use of infrared thermal imaging in the study of ice nucleation and freezing of plants. *J Therm Biol* 23(2): 81-89

George MF (1982) Freezing avoidance by supercooling of tissue water in vegetative and reproductive structures of *Juniperus virginiana*. Plant cold hardiness and freezing stress 2: 367-377

Gerdol R, Siffi C, Iacumin P, Gualmini M, Tomaselli M (2013) Advanced snowmelt affects vegetative growth and sexual reproduction of *Vaccinium myrtillus* in a sub-alpine heath. J Veg Sci 24:569–579

Griffith M, Lumb C, Wiseman CB, Wisniewski M, Johnson RW, Marangoni AG (2005) Antifreeze proteins modify the freezing process in planta. Plant Physiol 138: 330–340

Gusta LV, Wisniewski M (2013) Understanding plant cold hardiness: an opinion. Physiol Plant 147:4–14

Hacker J, Neuner G (2007) Ice propagation in plants visualized at the tissue level by infrared Differential thermal analysis (IDTA). Tree Physiol 27: 1661–1670

Hacker J, Neuner G (2008) Ice propagation in dehardened alpine plant species studied by infrared differential thermal analysis (IDTA). Arct. Antarct. Alp. Res. 40: 660–670

Hacker J, Spindelböck J, Neuner G (2008) Mesophyll freezing and effects of freeze dehydration visualized by simultaneous measurement of IDTA and differential imaging chlorophyll fluorescence. Plant Cell and Environ 31: 1725–1733

Hacker J, Ladinig U, Wagner J, Neuner G (2011). Inflorescences of alpine cushion plants freeze autonomously and may survive subzero temperatures by supercooling. Plant Sci 180(1): 149-156

Hekneby M, Antolín MC, Sánchez-Díaz M (2006) Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes. Environ Exp Bot 55(3): 305-314

Hughes MA, Dunn MA (1996) The molecular biology of plant acclimation to low temperature. J Exp Bot 47:291–305

Ishikawa M, Sakai A (1981) Freezing avoidance mechanisms by supercooling in some *Rhododendron* flower buds with reference to water relations. Plant Cell Physiol 22(6): 953-967

Ishikawa M, Sakai A (1985) Extraorgan freezing in wintering flower buds of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. Plant Cell Environ 8(5): 333-338

Körner C (2003) Alpine plant life, in: Functional Plant Ecology of High Mountains Ecosystems, second ed. Springer, Heidelberg.

Krog J (1955) Notes on temperature measurements indicative of special organization in arctic and subarctic plants for utilization of radiated heat from the sun. Physiol Plant 8: 836–839

Kuprian E, Briceño VF, Wagner J, Neuner G (2014) Ice barriers promote supercooling and prevent frost injury in reproductive buds, flowers and fruits of alpine dwarf shrubs throughout the summer. *Environ Exp Bot* 106: 4-12

Kuprian E, Tuong TD, Pfaller K, Wagner J, Livingston III DP, Neuner G (2016) Persistent Supercooling of Reproductive Shoots Is Enabled by Structural Ice Barriers Being Active Despite an Intact Xylem Connection. *PLoS one* 11(9): e0163160

Larcher W (2003) *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer Science & Business Media

Larcher W, Kainmüller C, Wagner J (2010) Survival types of high mountain plants under extreme temperatures. *Flora* 205:3–18

León-García IV, Lasso E (2019). High heat tolerance in plants from the Andean highlands: Implications for paramos in a warmer world. *PLoS one* 14(11): e0224218

Levitt J (1980) *Responses of Plants to Environmental Stresses*. Volume I. Chilling Freezing and High Temperature Stresses, 2nd ed. Academic Press, London, New York

Little L, Eidesen PB, Müller E, Dickinson KJ, Lord JM (2016). Leaf and floral heating in cold climates: do sub-Antarctic megaherbs resemble tropical alpine giants? *Polar Res* 35(1): 26030

Miller GA (1986) Pubescence, floral temperature and fecundity in species of *Puya* (Bromeliaceae) in the Ecuadorian Andes. *Oecologia* 70: 155–160.

Morales LV, Alvear C, Sanfuentes C, Saldaña A, Sierra-Almeida A (2020). Does the life-history strategy determine the freezing resistance of flowers and leaves of alpine herbaceous species?

Neuner G, Bannister P, Larcher W (1997) Ice formation and foliar frost resistance in attached and excised shoots from seedlings and adult trees of *Nothofagus menziesii*. *N Z J Bot* 35(2): 221-227

Neuner G, Beikircher B (2010) Critically reduced frost resistance of *Picea abies* during sprouting could be linked to cytological changes. *Protoplasma* 243:145–152

Neuner G, Eler A, Ladinig U, Hacker J, Wagner J (2013) Frost resistance of reproductive tissues during various stages of development in high mountain plants. *Physiol Plant* 147:88–100

Nobel PS, Smith SD (1983) High and low temperature tolerances and their relationships to distribution of agaves. *Plant Cell Environ* 6(9): 711-719

Quamme HA (1978) Mechanism of supercooling in overwintering peach flower buds. *J Am Soc Hort Sci* 103 (1): 57–61

Quamme HA, Su WA, Veto LJ (1995) Anatomical features facilitating supercooling of the flower within the dormant peach flower bud. *J Am Soc Hort Sci* 120: 814–822

Reinhardt D, Kuhlemeier C (2002) Plant architecture. *EMBO reports* 3(9): 846-851.

Rixen C, Dawes MA, Wipf S, Hagedorn F (2012) Evidence of enhanced freezing damage in treeline plants during six years of CO<sub>2</sub> enrichment and soil warming. *Oikos* 121:1532–1543

Sakai A, Larcher W (1987) Frost survival of plants: responses and adaptation to freezing stress. Springer-Verlag, Berlin, Germany

Santibañez F, Uribe J (1990) Atlas Agroclimático de Chile. Regiones V y Metropolitana. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Santiago

Sierra-Almeida A, Cavieres LA, Bravo LA (2009) Freezing resistance varies within the growing season and with the elevation in high- Andean species of central Chile. *New Phytol* 182:461–469

Sklenář P (2017) Seasonal variation of freezing resistance mechanisms in north temperate alpine plants. *Alp Bot* 127:31–39

Smith AP (1974) Bud Temperature in Relation to Nyctinastic Leaf Movement in an Andean Giant Rosette Plant *Biotropica* 6: 263–266. <https://doi.org/10.2307/2989670>

Stone W, Idle DB, Brennan RM (1993) Freezing events within overwintering buds of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). *Ann Bot* 72(6): 613-617

Strand Å, Foyer CH, Gustafsson P, Gardeström P, Hurry V (2003) Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant Cell Environ* 26(4): 523-535

Tsukaya H, Tsuge T (2001) Morphological adaptation of inflorescence in plants that develops at low temperature in early spring: the convergent evolution of “downy plants.” *Plant Biol* 3: 536–543

Uemura M, Peter S (1994) A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. *Plant Physiol* 104: 479-496

van der Kooi CJ, Kevan PG, Koski MH (2019) The thermal ecology of flowers. *Ann Bot* 124(3): 343-353

Wisniewski M, Fuller M (1999) Ice nucleation and deep supercooling in plants: new insights using infrared thermography. In R. Margesin and F. Schinner [eds.], *Cold-adapted organisms*, 105–118. Springer, Berlin, Germany

Wisniewski M, Fuller M, Glenn DM, Palta J, Carter J, Gusta L., ... Duman J (2001) Factors involved in ice nucleation and propagation in plants: an overview based on

new insights gained from the use of infrared thermography. *Buvisindi J Agr Sci* 14: 41-47

Wisniewski M, Gusta L, Neuner G (2014) Adaptive mechanisms of freeze avoidance in plants: A brief update. *Environ Exp Bot* 99: 133–140

Workmaster BAA, Palta JP, Wisniewski M (1999) Ice nucleation and propagation in cranberry uprights and fruit using infrared video thermography. *J Am Soc Hortic Sci* 124(6): 619-625

Wingler A (2015) Comparison of signalling interactions determining annual and perennial plant growth in response to low temperature. *Front Plant Sci* 5:794. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00794>

Yang Y, Körner C, Sun H (2008) The ecological significance of pubescence in *Saussurea medusa*, a high elevation Himalayan “woolly plant.” *Arct Antarct Alp Res* 40: 250–255.

Yang Y, Sun H (2009). The bracts of *Saussurea velutina* (Asteraceae) protect inflorescences from fluctuating weather at high elevations of the Hengduan Mountains, Southwestern China. *Arct Antarct Alp Res* 41(4): 515-521



## TABLAS

**Tabla 3.1.** Información taxonómica, estrategia de historia de vida, forma de crecimiento y tipo de flor de las 14 especies herbáceas de los Andes de Chile central en las cuales se realizaron los análisis de patrones de congelamiento mediante termografía de infrarrojos.

<b>Species</b>	<b>Family</b>	<b>Life strategy</b>	<b>Growth form</b>	<b>Flower type</b>
<i>Chaetanthera flabellata</i>	Asteraceae	Annual	Rosette	Capitulum
<i>Chaetanthera linearis</i>	Asteraceae	Annual	Forb	Capitulum
<i>Collomia biflora</i>	Polemoniaceae	Annual	Forb	Terminal
<i>Lupinus microcarpus</i>	Fabaceae	Annual	Forb	Spike
<i>Quinchamalium parviflorum</i>	Schoepfiaceae	Annual	Forb	Terminal
<i>Scyphanthus elegans</i>	Loasaceae	Annual	Forb	Cyme
<i>Alstroemeria exerens</i>	Alstroemeriaceae	Perennial	Forb	Umbel
<i>Hordeum comosum</i>	Poaceae	Perennial	Grass	Spikelet
<i>Perezia carthamoides</i>	Asteraceae	Perennial	Forb	Capitulum
<i>Phacelia brachyantha</i>	Boraginaceae	Perennial	Forb	Cyme
<i>Phacelia secunda</i>	Boraginaceae	Perennial	Forb	Cyme
<i>Pozoa coriacea</i>	Apiaceae	Perennial	Forb	Umbel
<i>Sanicula graveolens</i>	Apiaceae	Perennial	Forb	Umbel
<i>Stachys philippiana</i>	Lamiaceae	Perennial	Forb	Spike



**Tabla 3.2.** Variables obtenidas del análisis de los patrones de congelamiento en 14 especies herbáceas de los Andes de Chile central. INT: temperatura de nucleación del hielo. FT: Tolerante al congelamiento, FA: evasora del congelamiento. BEPH: barrera estructural de propagación de hielo, BTPH: barrera térmica de propagación de hielo. Los valores indican el promedio  $\pm$  error estándar.

Species	INT excised flowers (°C)	LT <sub>50</sub> (°C)	INT flowers (°C)	INT peduncles (°C)	Delta time	Mechanism	Ice barriers
<b>Annual species</b>							
<i>Chaetanthera flabellata</i>	-9.4 $\pm$ 0.7	-12.9 $\pm$ 0.2	-3.9 $\pm$ 0.2	-5.8 $\pm$ 0.7	31 $\pm$ 6	FT	BEPH/BTPH
<i>Chaetanthera linearis</i>	-9.0 $\pm$ 0.9	-20.0 $\pm$ 0.0	-7 $\pm$ 0.4*	-6.4 $\pm$ 0.4	10 $\pm$ 6	FT	BEPH/BTPH
<i>Collomia biflora</i>	-11.6 $\pm$ 0.9	-9.1 $\pm$ 0.9	-7.6 $\pm$ 0.8	-5.1 $\pm$ 0.2	42 $\pm$ 7	FA	BEPH
<i>Lupinus microcarpus</i>	-10.7 $\pm$ 1.1	-9.9 $\pm$ 0.9	-7.4 $\pm$ 0.4	-5.9 $\pm$ 0.2	4 $\pm$ 2	FA	BEPH
<i>Phacelia brachyantha</i>	-15.0 $\pm$ 0.9	-5.5 $\pm$ 0.4	-9.2 $\pm$ 0.0	-4.8 $\pm$ 0.0	125 $\pm$ 0	FA	BEPH/BTPH
<i>Quinchamalium parviflorum</i>	-10.5 $\pm$ 0.6	-7.4 $\pm$ 0.6	ND	-7.6 $\pm$ 0.7	ND	ND	BEPH
<i>Scyphanthus elegans</i>	-6.8 $\pm$ 0.5	-6.5 $\pm$ 0.2	-6.2 $\pm$ 1.1	-5.7 $\pm$ 0.5	1 $\pm$ 1	FA	No barriers
<b>Perennial species</b>							
<i>Alstroemeria exerens</i>	-6.6 $\pm$ 0.2	-6.2 $\pm$ 0.4	-5.7 $\pm$ 0.5	ND	ND	FA	No barriers
<i>Hordeum comosum</i>	-11.5 $\pm$ 0.5	-14.3 $\pm$ 0.1	-8.6 $\pm$ 0.6	ND	ND	FT	BEPH
<i>Perezia carthamoides</i>	-9.3 $\pm$ 0.5	-17.7 $\pm$ 1.3	-11.4 $\pm$ 0.1*	ND	ND	FT	BTPH
<i>Phacelia secunda</i>	ND	ND	-7.7 $\pm$ 0.0	-5.1 $\pm$ 0.7	117 $\pm$ 0	ND	BEPH/BTPH
<i>Pozoa coriacea</i>	ND	ND	-11.1 $\pm$ 1.4	-7.9 $\pm$ 0.4	161 $\pm$ 21	ND	BEPH/BTPH
<i>Sanicula graveolens</i>	-9.7 $\pm$ 1.0	-6.8 $\pm$ 0.3	-10.6 $\pm$ 0.5	-7.3 $\pm$ 0.8	63 $\pm$ 8	FA	BTPH
<i>Stachys philippiana</i>	-16.8 $\pm$ 0.5	-8.5 $\pm$ 0.8	-5.0 $\pm$ 0.8	-5.9 $\pm$ 0.4	27 $\pm$ 12	FT	BEPH

\* asterisks in INT flowers column shows INT in ligulated flowers; ND: no data.

## LEGENDA DE FIGURAS

**Fig. 1** Representación gráfica del montaje del experimento de análisis termográfico.

**Fig. 2** Imágenes representativas de las especies investigadas antes y durante el experimento de simulación de heladas. (a) Imagen digital de brotes reproductivos de las especies con inflorescencias tipo capítulo: *Chaetanthera flabellata*, *Chaetanthera linearis* y *Perezia carthamoides*; (b-g) Imágenes termográficas en las que se visualizan los eventos de nucleación como las áreas más iluminadas, las flechas azules indican la región específica donde ocurrió la nucleación del hielo. Las temperaturas de nucleación del hielo (INT °C) se indican en la parte inferior izquierda de cada imagen. El tiempo (en horas y minutos) transcurrido desde el inicio del experimento de simulación de heladas se indica en la esquina inferior derecha de cada imagen a continuación del INT.

**Fig. 3** Imágenes representativas de las especies investigadas antes y durante el experimento de simulación de heladas. (a) Imagen digital de brotes reproductivos de las especies con inflorescencias tipo cima: *Phacelia brachyantha*, *Phacelia secunda* y *Scyphanthus elegans*; (b-g) Imágenes termográficas en las que se visualizan los eventos de nucleación como las áreas más iluminadas, las flechas azules indican la región específica donde ocurrió la nucleación del hielo. Las temperaturas de nucleación del hielo (INT °C) se indican en la parte inferior izquierda de cada imagen. El tiempo (en horas y minutos) transcurrido desde el

inicio del experimento de simulación de heladas se indica en la esquina inferior derecha de cada imagen a continuación del INT.

**Fig. 4** Imágenes representativas de las especies investigadas antes y durante el experimento de simulación de heladas. (a) Imagen digital de brotes reproductivos de las especies con inflorescencias tipo espiga: *Lupinus microcarpus* y *Stachys philippiana*; (b-g) Imágenes termográficas en las que se visualizan los eventos de nucleación como las áreas más iluminadas, las flechas azules indican la región específica donde ocurrió la nucleación del hielo. Las temperaturas de nucleación del hielo (INT °C) se indican en la parte inferior izquierda de cada imagen. El tiempo (en horas y minutos) transcurrido desde el inicio del experimento de simulación de heladas se indica en la esquina inferior derecha de cada imagen a continuación del INT.

**Fig. 5** Imágenes representativas de las especies investigadas antes y durante el experimento de simulación de heladas. (a) Imagen digital de brotes reproductivos de la especie con inflorescencias tipo espiguilla *Hordeum comosum*; (b-g) Imágenes termográficas en las que se visualizan los eventos de nucleación como las áreas más iluminadas, las flechas azules indican la región específica donde ocurrió la nucleación del hielo. Las temperaturas de nucleación del hielo (INT °C) se indican en la parte inferior izquierda de cada imagen. El tiempo (en horas y minutos) transcurrido desde el inicio del experimento de simulación de heladas se indica en la esquina inferior derecha de cada imagen a continuación del INT.

**Fig. 6** Imágenes representativas de las especies investigadas antes y durante el experimento de simulación de heladas. (a) Imagen digital de brotes reproductivos de las especies con inflorescencias tipo terminal: *Collomia biflora* y *Quinchamalium parviflorum*; (b-f) Imágenes termográficas en las que se visualizan los eventos de nucleación como las áreas más iluminadas, las flechas azules indican la región específica donde ocurrió la nucleación del hielo. Las temperaturas de nucleación del hielo (INT °C) se indican en la parte inferior izquierda de cada imagen. El tiempo (en horas y minutos) transcurrido desde el inicio del experimento de simulación de heladas se indica en la esquina inferior derecha de cada imagen a continuación del INT.



**Fig. 7** Imágenes representativas de las especies investigadas antes y durante el experimento de simulación de heladas. (a) Imagen digital de brotes reproductivos de las especies con inflorescencias tipo umbela: *Alstroemeria exerens*, *Sanicula graveolens* y *Pozoa coriacea*; (b-g) Imágenes termográficas en las que se visualizan los eventos de nucleación como las áreas más iluminadas, las flechas azules indican la región específica donde ocurrió la nucleación del hielo. Las temperaturas de nucleación del hielo (INT °C) se indican en la parte inferior izquierda de cada imagen. El tiempo (en horas y minutos) transcurrido desde el inicio del experimento de simulación de heladas se indica en la esquina inferior derecha de cada imagen a continuación del INT.

**Fig. 8** Temperatura de nucleación de hielo (INT) en flores (fucsia), hojas (verde claro), flores liguladas (anaranjado) y pedúnculos (verde oscuro) en especies anuales y perennes. Cada uno de los puntos (círculos de colores) representan el valor promedio y las líneas representan el error estándar (ES). Líneas horizontales: ES del tiempo (minutos) y verticales: ES de INT (°C).

**Fig. 9** Temperatura de nucleación de hielo (INT) en flores (fucsia), hojas (verde claro), flores liguladas (anaranjado) y pedúnculos (verde oscuro) en especies anuales. Cada uno de los puntos (círculos de colores) representan el valor promedio y las líneas representan el error estándar (ES). Líneas horizontales: ES del tiempo (minutos) y verticales: ES de INT (°C). **Cf** *Chaetanthera flabellata*, **Cl** *Chaetanthera linearis*, **Cb** *Collomia biflora*, **Lm** *Lupinus microcarpus*, **Pb** *Phacelia brachyantha*, **Qp** *Quinchamalium parviflorum* y **Se** *Scyphanthus elegans*.

**Fig. 10** Temperatura de nucleación de hielo (INT) en flores (fucsia), hojas (verde claro), flores liguladas (anaranjado) y pedúnculos (verde oscuro) en especies perennes. Cada uno de los puntos (círculos de colores) representan el valor promedio y las líneas representan el error estándar (ES). Líneas horizontales: ES del tiempo (minutos) y verticales: ES de INT (°C). **Ae** *Alstroemeria exerens*, **Hc** *Hordeum comosum*, **Sg** *Sanicula graveolens*, **Sp** *Stachys philippiana*, **Pc** *Perezia carthamoides*, **Ps** *Phacelia secunda* y **Pco** *Pozoa coriácea*.

**Fig. 11** Delta temporal INT flores-INT pedúnculos. El delta representa el tiempo que transcurre desde la nucleación de hielo en pedúnculos hasta la nucleación

de hielo en flores. Las cajas representan la mediana (línea central) y el primer y tercer cuartil (bordes de la caja). Los bigotes representan los valores máximo y mínimo dentro de 1,5 veces el rango intercuartílico. Puntos negros dentro de cada caja representan el promedio. Especies anuales (izquierda, cajas verdes): Cf, *Chaetanthera flabellata*; Cl, *Chaetanthera linearis*; Cb, *Collomia biflora*; Lm, *Lupinus microcarpus*; Se, *Scyphanthus elegans*. Especies perennes (derecha, cajas moradas): Sg, *Sanicula graveolens*; Sph, *Stachys philippiana* y, Pco, *Pozoa coriacea*.

**Fig. 12** Temperatura de inflorescencias al final de la secuencia de video 1 (1h 50 min), comparación por tipo de inflorescencia. Las cajas representan la mediana (línea central) y el primer y tercer cuartil (bordes de la caja). Los bigotes representan los valores máximo y mínimo dentro de 1,5 veces el rango intercuartílico. Puntos negros dentro de cada caja representan el promedio.

**Fig. 13** Diagrama resumen de las especies tolerantes y evasoras, que presentan barreras estructurales de propagación de hielo (BEPH) y/o barreras térmicas de propagación de hielo (BTPH) en sus brotes reproductivos. Cuadros morados: especies perennes; cuadros verdes: especies anuales.

## FIGURAS

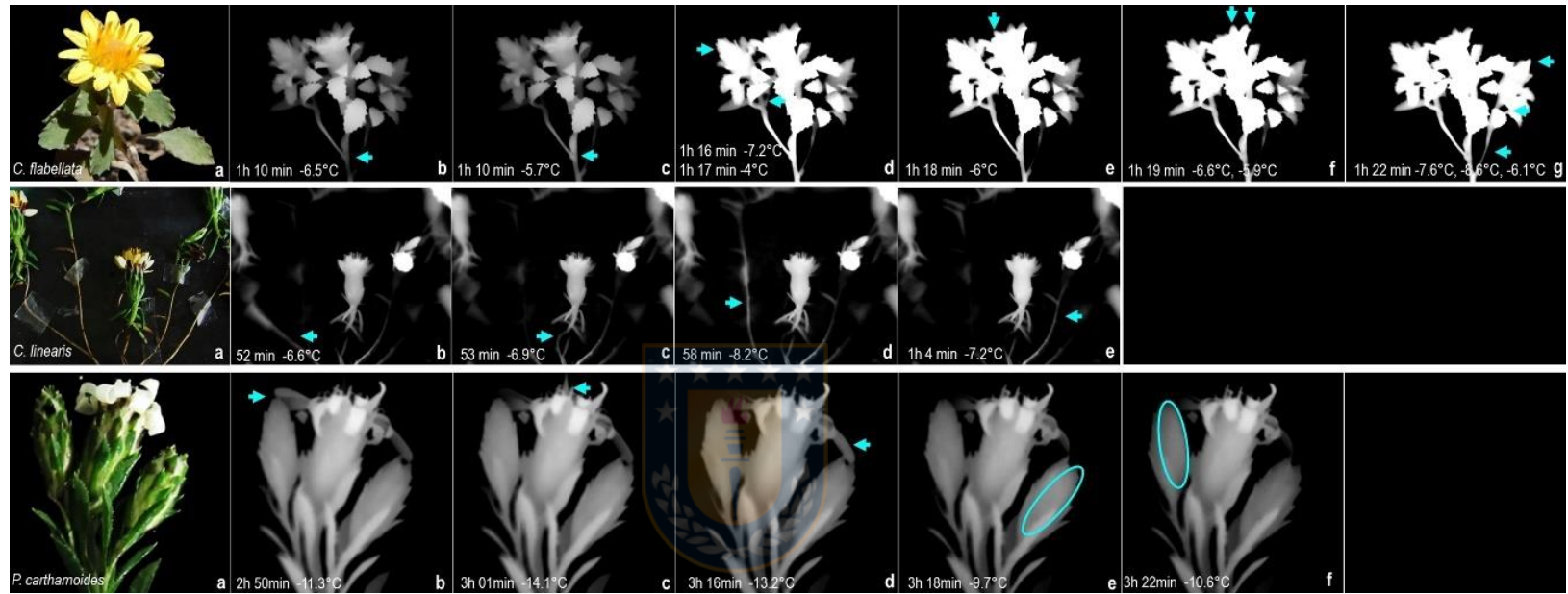
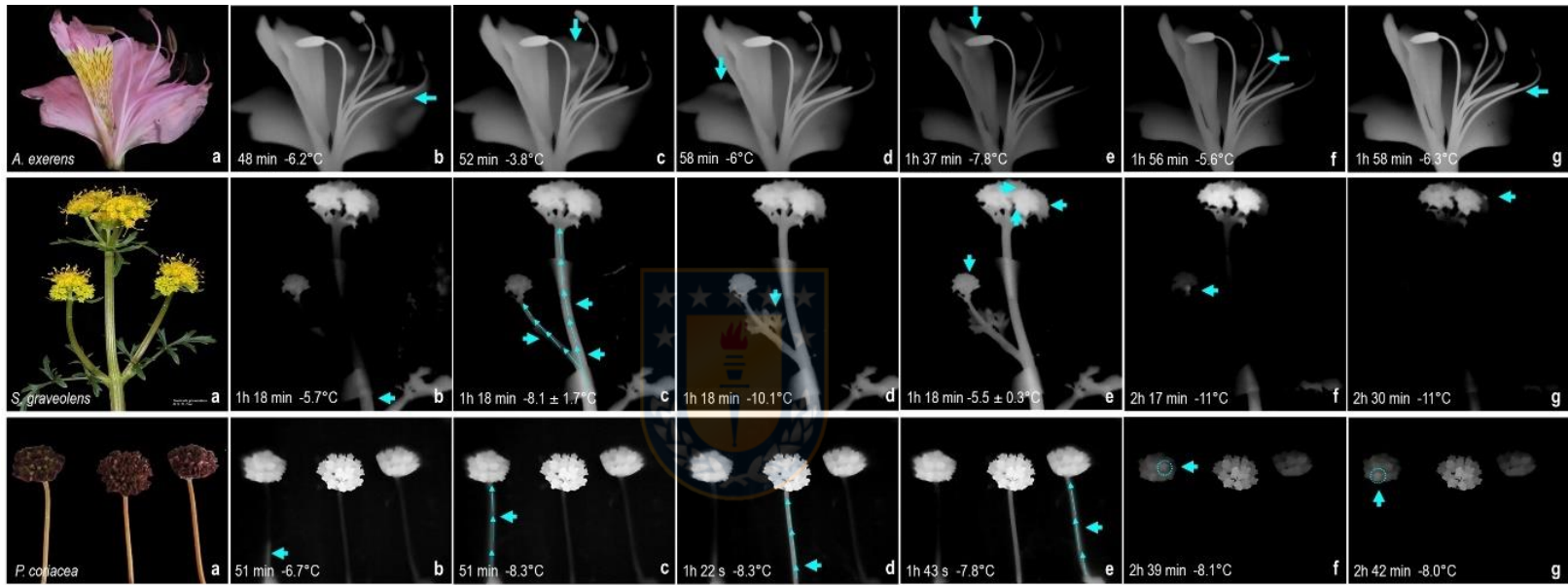
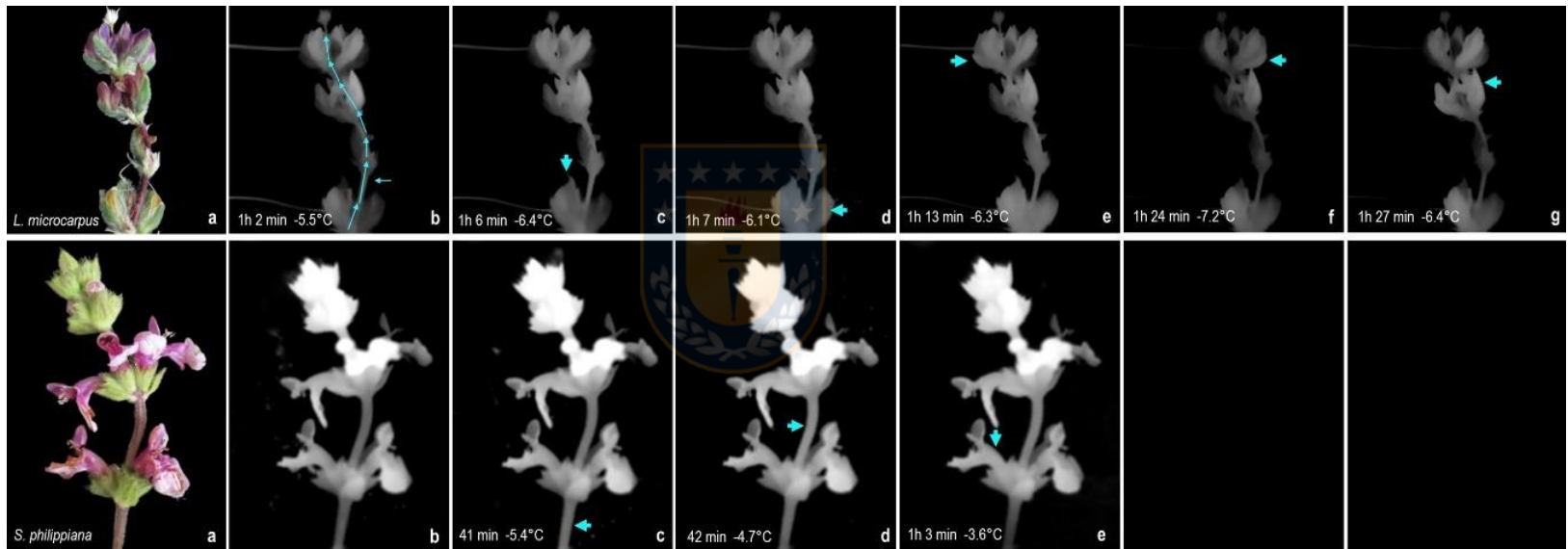


Fig. 2

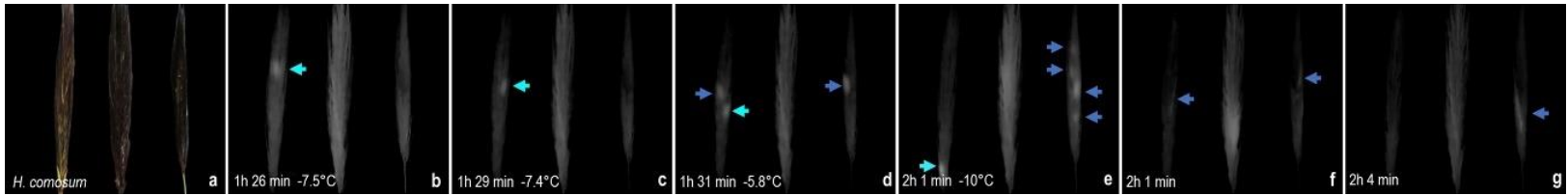


**Fig. 3**

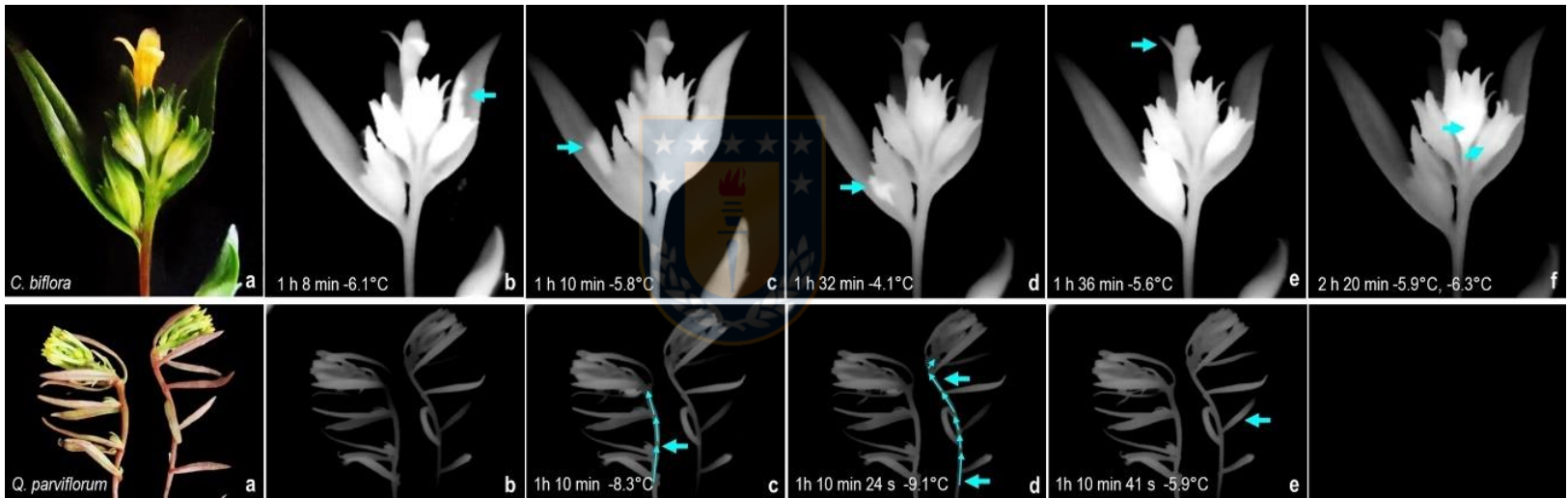




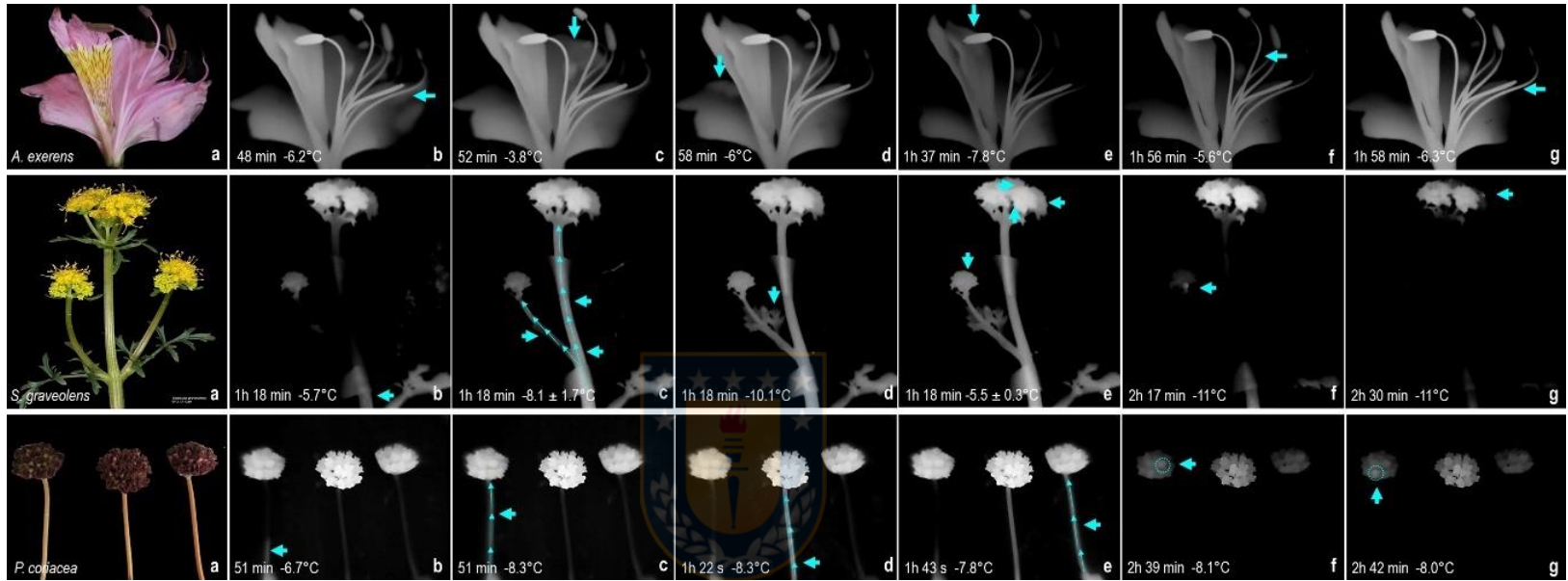
**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 7**

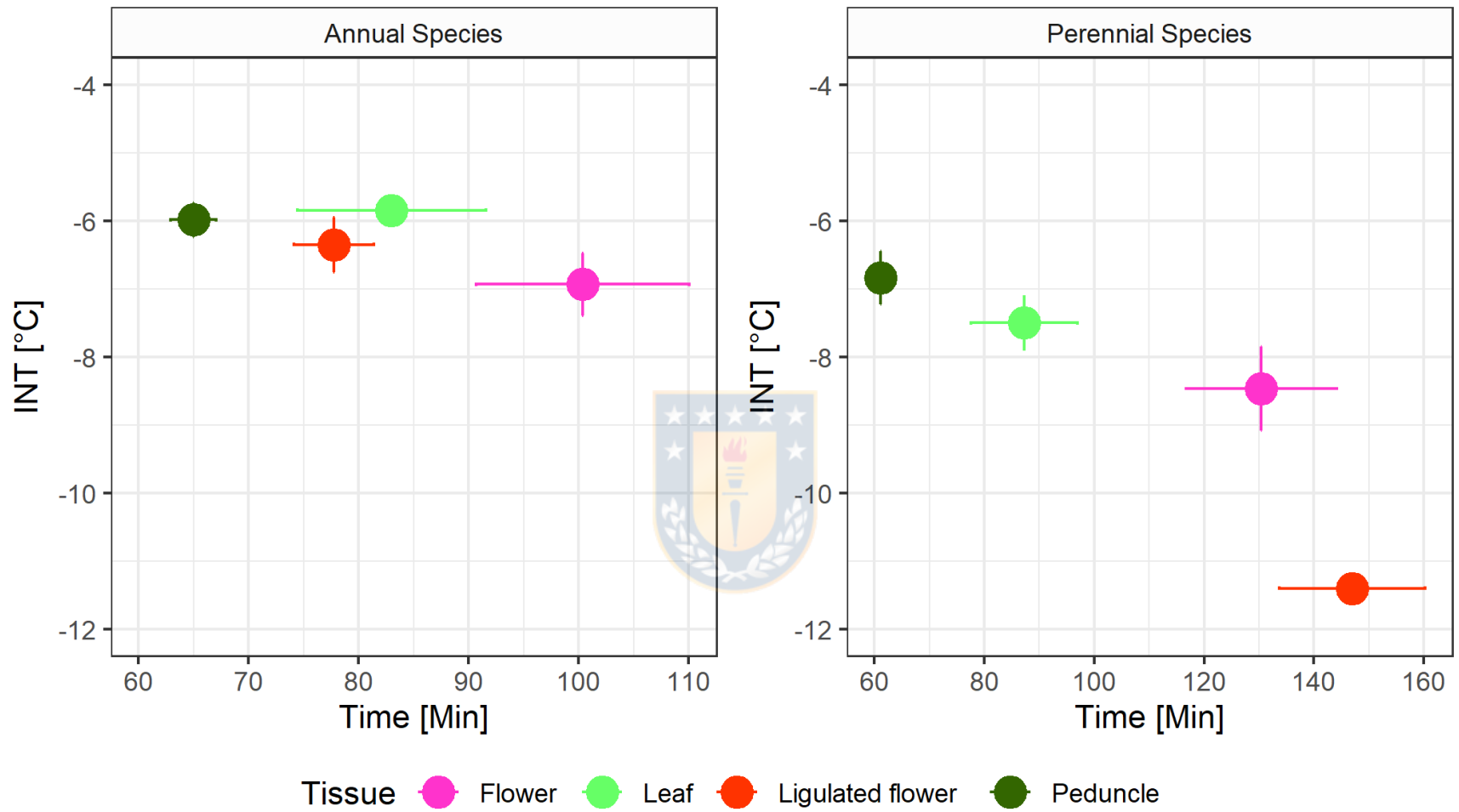
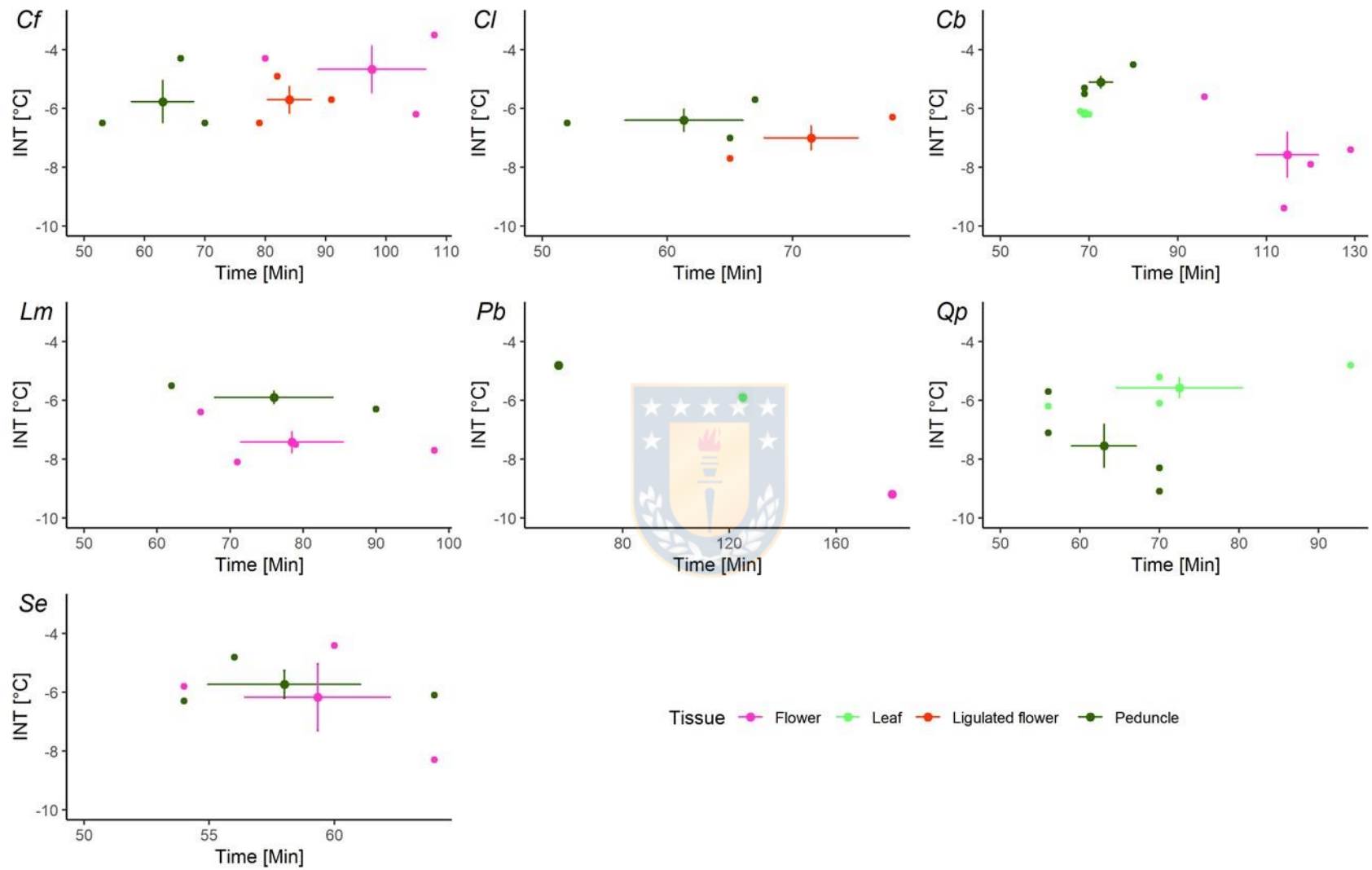


Fig. 8



**Fig. 9**

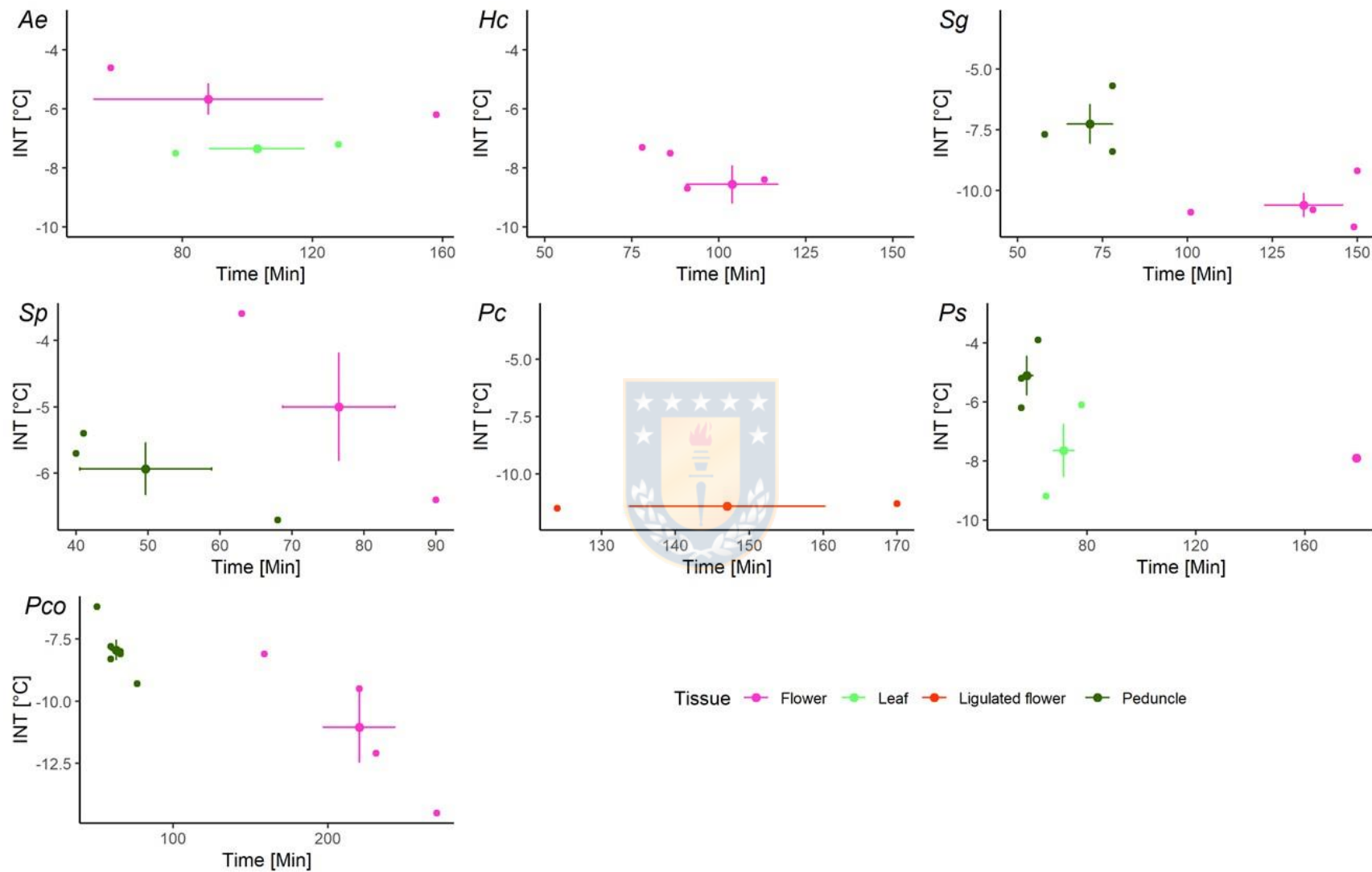
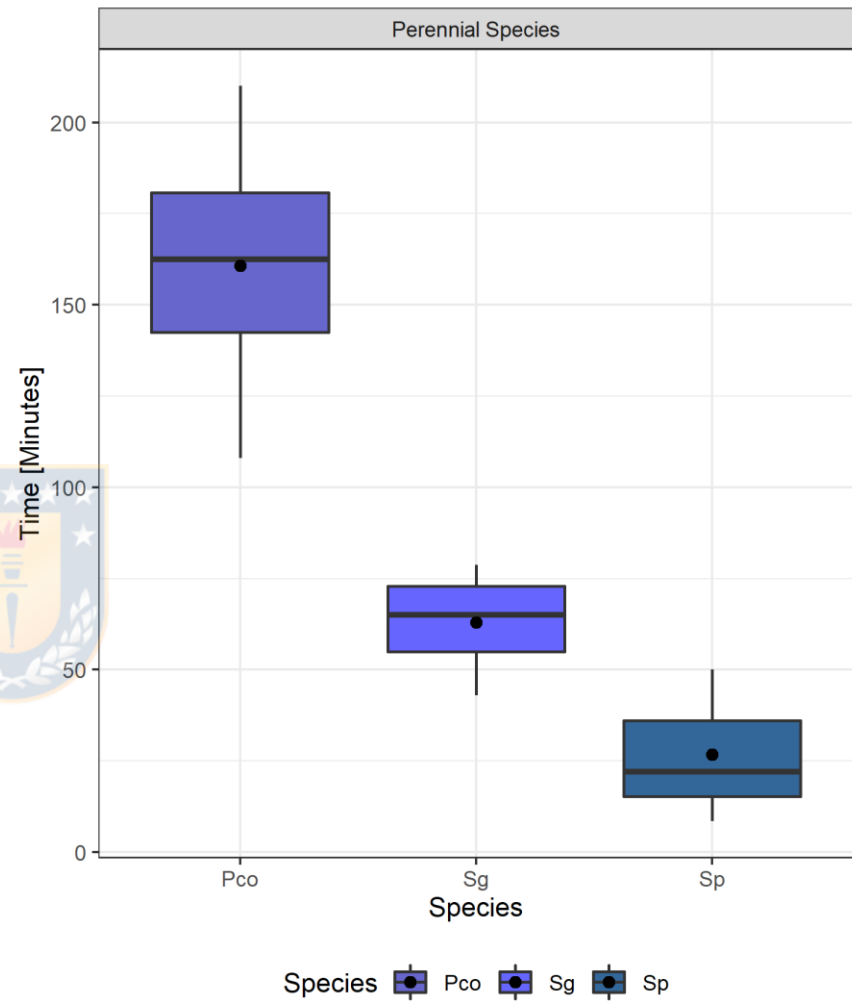
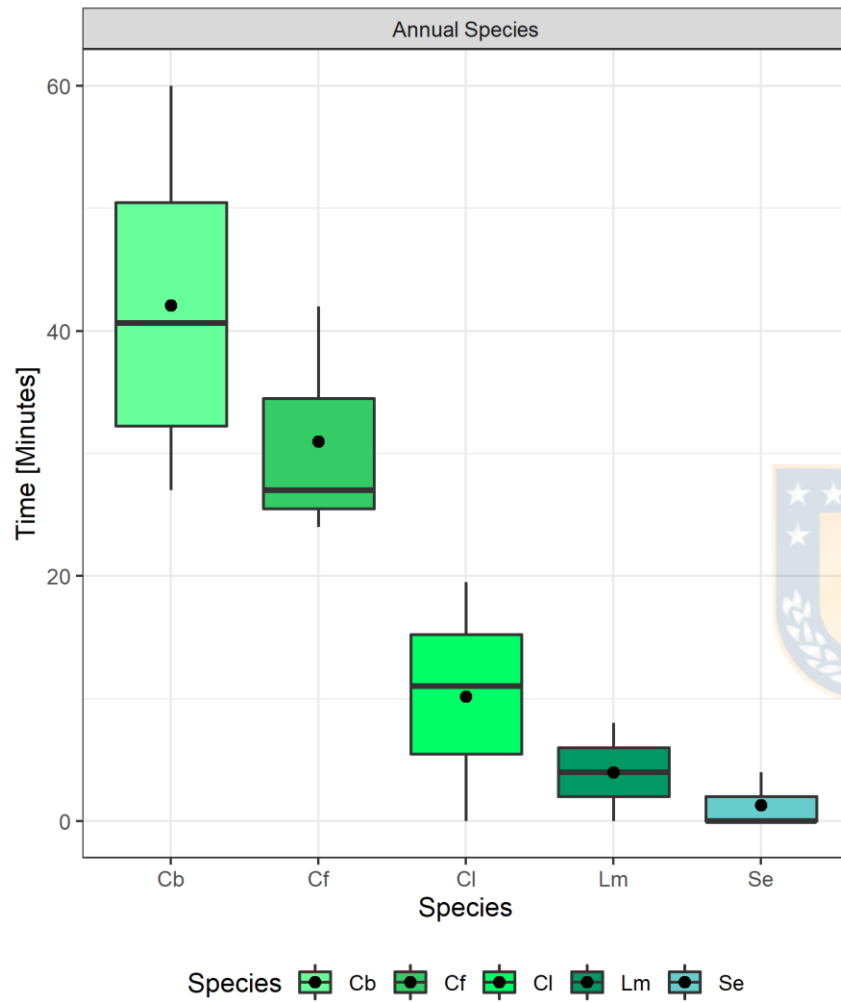


Fig. 10



**Fig. 11**

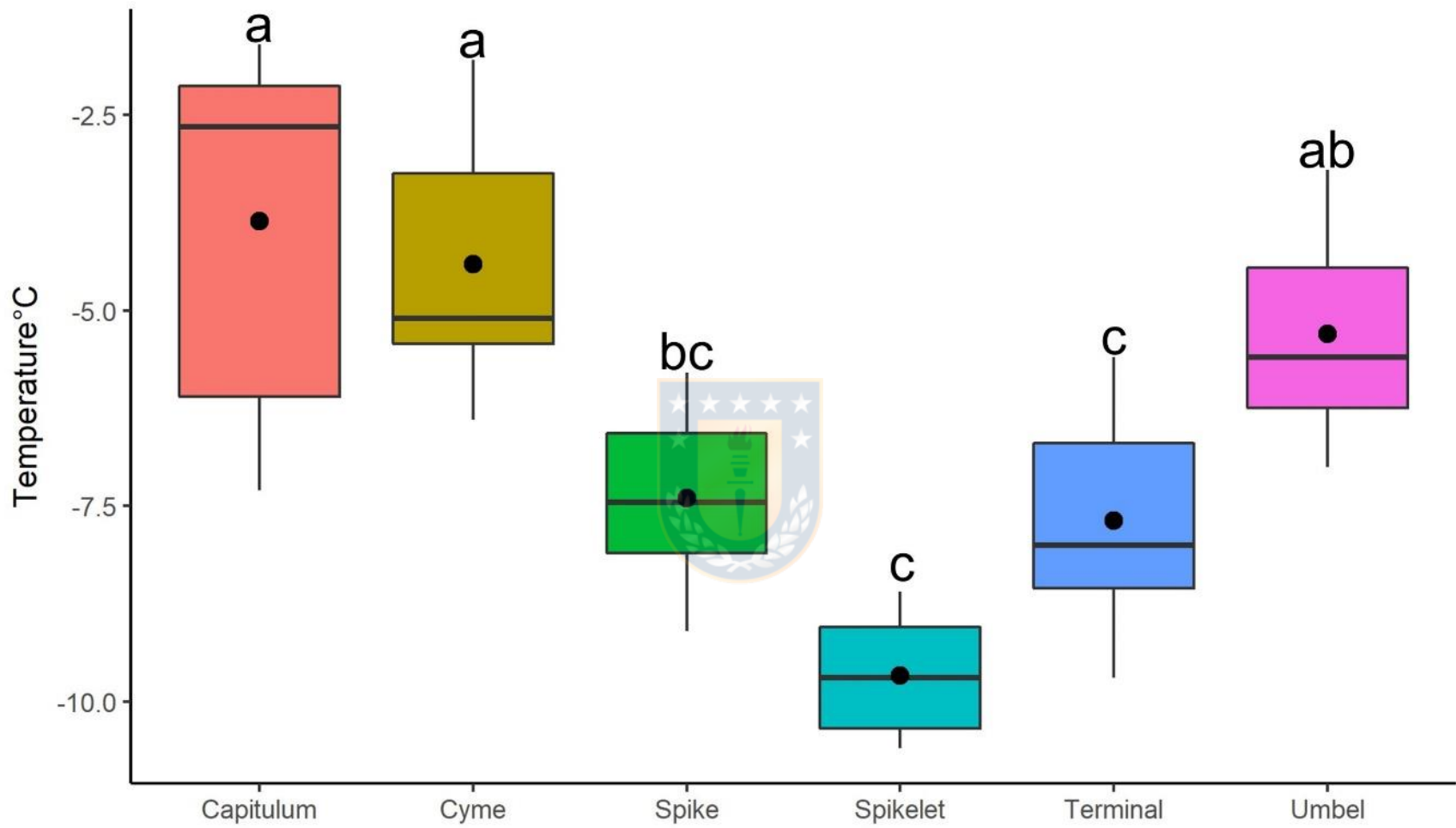


Fig. 12



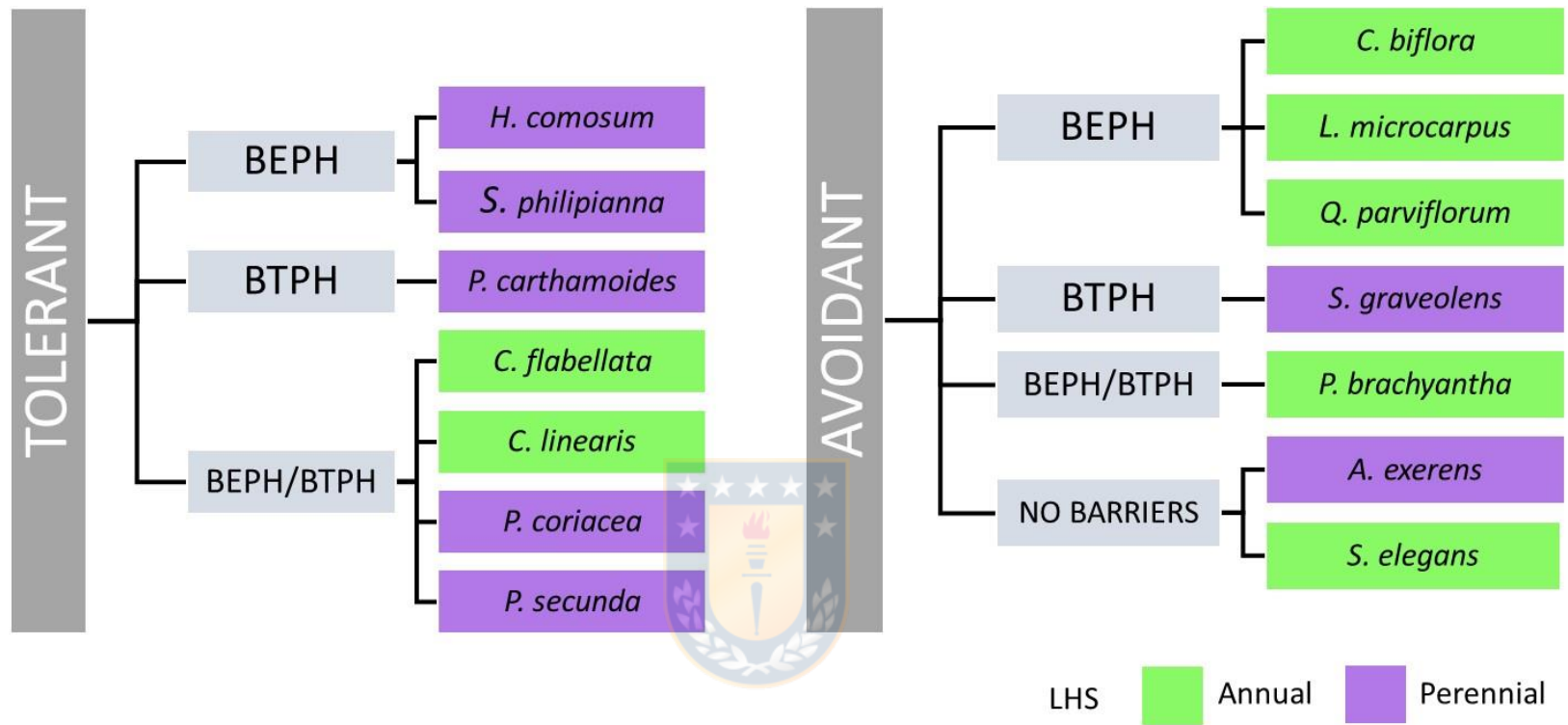


Fig. 13

## **ANEXO 1: Patrones de congelamiento en brotes reproductivos: descripción especie-específica**

### **1. Capítulos florales**

*1.1 Chaentathera flabellata:* La secuencia de imágenes termográficas en un brote reproductivo de *C. flabellata* (Fig. 2a) mostró que la nucleación del hielo ocurrió en el tallo a  $-6.5^{\circ}\text{C}$ , 1h 10 min después de iniciado el experimento de simulación de heladas (Fig.2b). El hielo se propagó secuencialmente en los pedúnculos adyacentes; en los siguientes 7 min en el pedúnculo izquierdo (INT:  $-7.2^{\circ}\text{C}$ ) y en los siguientes 12 min en el pedúnculo derecho (INT:  $-7.6^{\circ}\text{C}$ ) (Fig. 2d-2g). Estos resultados reflejan un patrón de propagación del hielo de abajo hacia arriba. En esta especie, la propagación del hielo se produjo sin obstáculos desde el tallo hasta los órganos florales. En el caso del capullo floral (pre-ántesis), la propagación del hielo se produjo rápidamente, alcanzando el ápice del capullo floral, segundos después de que se registrara la nucleación en el tallo. Para ambos capullos florales, la INT fue más alta que la registrada en el tallo ( $-4.0^{\circ}\text{C}$  y  $-6.0^{\circ}\text{C}$ , en el capullo izquierdo y derecho, respectivamente; Figs. 2d y 2g). En el capítulo abierto, el hielo se propagó por la parte exterior de la inflorescencia y se observaron eventos de nucleación en las flores liguladas situadas en la parte exterior del capítulo ( $-6.2^{\circ}\text{C} \pm 0.2$  ES; 1h 19 min; Figs. 2e y 2f). Luego de la nucleación de las flores liguladas solo se observó la disminución de la temperatura de todos los órganos, sin registrarse eventos de nucleación en las flores tubulares del capítulo. 3h 40 min después de iniciado el experimento de simulación de heladas (Fig. 12), los tejidos vegetativos y

reproductivos alcanzaron temperaturas cercanas a los  $-20^{\circ}\text{C}$ , con la excepción de la parte delantera de la inflorescencia, que alcanzó una temperatura más alta en comparación con el resto del tejido, posiblemente debido a su mayor distancia con la placa ( $-16^{\circ}\text{C}$ ). Un patrón de congelamiento similar se registró en la réplica 2, donde la nucleación del hielo se produjo en primer lugar en la base del tallo principal ( $-4.3^{\circ}\text{C}$ , 66 minutos). Posteriormente, el hielo se propagó desde los pedúnculos exteriores ( $-5.4^{\circ}\text{C}$  y  $-6.1^{\circ}\text{C}$  pedúnculo izquierdo y derecho; 69 minutos) a los capullos florales ( $-6.9^{\circ}\text{C}$  y  $-3.4^{\circ}\text{C}$ , capullo izquierdo y derecho respectivamente; 69 minutos) y finalmente el hielo se propagó en toda la inflorescencia principal (temperatura media de toda la inflorescencia  $-5.7^{\circ}\text{C}$ , 91 minutos). Posteriormente, se observa un patrón moteado de pequeños eventos de nucleación, casi imperceptibles en el centro de la inflorescencia, posiblemente debido a la nucleación individual de flores tubulares (108 min). El mismo patrón moteado se observó en el centro de la inflorescencia en la réplica 3 (por ejemplo, INT:  $-4.9^{\circ}\text{C}$ , 80 minutos; INT:  $-6.2^{\circ}\text{C}$ , 105 minutos), 27 minutos después de la formación de hielo en el tallo (INT:  $-6.5^{\circ}\text{C}$ , 53 minutos).

1.2 *Chaentathera linearis*: La secuencia de imágenes termográficas en un individuo completo de *C. linearis* (Fig. 2a) mostró que la nucleación del hielo ocurrió en el tallo a  $-6.5^{\circ}\text{C}$ , 52 min después de iniciado el experimento de simulación de heladas (Fig.2b). El hielo se propagó secuencialmente en los tallos adyacentes durante los siguientes 11 min (Fig.2b-2e), en una secuencia de abajo hacia arriba. Aunque el hielo se propagó hasta la base de los capítulos, este no se propagó en los mismos. Pasados 1 h 50 min (Fig. A1) desde el inicio del experimento de simulación de

heladas, los tallos en los que se registró nucleación y propagación de hielo alcanzaron temperaturas cercanas a los  $-10^{\circ}\text{C}$ , a diferencia de los capítulos, que alcanzaron temperaturas cercanas a los  $-7^{\circ}\text{C}$ . Pasados 3h 40 min, los tallos y capítulos alcanzaron temperaturas cercanas a los  $-20^{\circ}\text{C}$ , sin embargo, la parte interior del capítulo, donde se ubican las flores tubulares, alcanzaron temperaturas de  $-17^{\circ}\text{C}$ . En la réplica 2, se detectaron eventos de nucleación en el pedicelo (1h 7min,  $-5.7^{\circ}\text{C}$ ) y en la parte externa de la inflorescencia, en brácteas de involucro (1h 7min,  $-4.4^{\circ}\text{C}$ ) y en un par de flores liguladas (1h 18 min;  $-6.3^{\circ}\text{C}$ ). Sin embargo, no se registró ningún evento de nucleación en las flores tubulares de la parte interna de la inflorescencia. A diferencia de la réplica 1, en la réplica 2 la formación de hielo se produce desde la placa y no desde el pedúnculo al capítulo, lo que podría explicar el cambio en el patrón de propagación del hielo. En las réplicas 3 y 4, se registró el mismo patrón de propagación del hielo que en la réplica 1, donde la formación de hielo se produjo en la base tallo hasta el pedicelo ( $-7^{\circ}\text{C}$ ), sin embargo, el hielo no se propagó dentro de las inflorescencias. En la réplica 4, se observaron dos eventos de nucleación, en una flor ligulada y en una flor tubular ( $-7.7^{\circ}\text{C}$ , 1h 5 min y  $-8.3^{\circ}\text{C}$ , 57 min).

1.3 *Perezia carthamoides*: La secuencia de imágenes termográficas en un brote reproductivo de *P. carthamoides* (Fig. 2a) mostró una disminución de la temperatura de los tejidos vegetativos y reproductivos. Pasados 1h 50 min del inicio del experimento de simulación de heladas se registraron claras diferencias en la temperatura de estos tejidos. La temperatura en las hojas y el pedúnculo era de  $-8.7^{\circ}\text{C}$ , mientras que la temperatura del capítulo floral era de  $-2.7^{\circ}\text{C}$  (Fig. 11).

Posteriormente, se registraron eventos de nucleación en flores liguladas y capullos florales. En el caso de las flores liguladas, los eventos de nucleación se produjeron de forma independiente (Fig. 2b-2d; INT:  $-12.3^{\circ}\text{C}$ ), y luego se observó un rápido descenso de la temperatura. En capullos florales, la nucleación del hielo se observó en una gran sección del capullo, y no en un punto específico como lo observado en las flores liguladas (Fig. 2e-2f). Pasadas 3h 40 min del inicio del experimento de simulación de heladas, el pedúnculo y las hojas alcanzaron temperaturas de  $-18^{\circ}\text{C}$ , el capullo floral alcanzó la temperatura de  $-14^{\circ}\text{C}$ . mientras que el capítulo floral alcanzó la temperatura de  $-7.5^{\circ}\text{C}$ . excepto aquellas flores liguladas donde la temperatura era de  $-16^{\circ}\text{C}$  (Fig. A1). En la réplica 2 solo se registraron eventos de nucleación en flores liguladas (R2, INT:  $-11.5^{\circ}\text{C} \pm 0.4 \text{ ES}$ ), mientras que en la réplica 3 sólo en el pedúnculo y en una hoja (INT:  $5.3^{\circ}\text{C}$  y  $8.6^{\circ}\text{C}$ , respectivamente).

## 2. Inflorescencias cima

2.1 *Phacelia brachyantha*: La secuencia de imágenes termográficas en el brote reproductivo de *P. brachyantha* (Fig. 3a) mostró que la nucleación de hielo ocurrió a  $-5.9^{\circ}\text{C}$  en la hoja más cercana a la base del pedúnculo, 56 minutos después de iniciado el experimento de simulación de heladas (Fig. 3b). El hielo se propagó rápidamente a lo largo del pedúnculo, durante los siguientes segundos (56 minutos), alcanzando el extremo superior del pedúnculo (INT:  $-4.8^{\circ}\text{C}$ , Fig. 3c). Sin embargo, el hielo no se propagó hacia las inflorescencias. Posteriormente, se registró un evento de nucleación en la hoja inferior (INT:  $-4.9^{\circ}\text{C}$ , 1h 17 min; Fig. 3d-3e). Pasados 1h 50 min del inicio del experimento de simulación de heladas, la inflorescencia alcanzó los  $-5.8^{\circ}\text{C}$ , mientras que el pedúnculo y las hojas alcanzaron

los  $-9.8^{\circ}\text{C}$  (Fig. A2). Posteriormente, solo se registró un evento de nucleación en una de las flores a  $-9.2^{\circ}\text{C}$  (3h 1min; Fig. 3f). Pasadas 3h 40 min del inicio del experimento de simulación de heladas, las diferencias de temperatura entre los órganos se mantuvieron. La inflorescencia alcanzó  $-14.3^{\circ}\text{C}$ , mientras que el pedúnculo y las hojas alcanzaron  $-19.4^{\circ}\text{C}$ . En la réplica 2, se registró la disminución de la temperatura de todos los órganos, sin eventos de nucleación. Al igual que la réplica 1, pasadas 3h 40 min del inicio del experimento de simulación de heladas se registraron diferencias en la temperatura de los órganos. La inflorescencia alcanzó los  $-4.4^{\circ}\text{C}$ , mientras que el pedúnculo y las hojas alcanzaron  $-19^{\circ}\text{C}$ . La hoja ubicada debajo de la inflorescencia alcanzó  $-9.3^{\circ}\text{C}$ , lo que se debió probablemente a su mayor distancia respecto a la placa.

**2.2 *Phacelia secunda*:** La secuencia de imágenes termográficas en el brote reproductivo *P. secunda* (Fig. 3a) mostró que la nucleación de hielo ocurrió en el pedúnculo a  $-3.9^{\circ}\text{C}$ , 1h 02 minutos después de iniciado el experimento de simulación de heladas (Fig. 3b). El hielo se propagó rápidamente a lo largo del pedúnculo a los diferentes pedicelos de forma continua e independiente (Fig. 3b-3g). El hielo se propagó desde el pedúnculo hasta el pedicelo derecho, en el cual se registró un evento de nucleación en un cáliz vacío situado en el pedicelo ( $-2.9^{\circ}\text{C}$ , 1h 02 min, Fig. 3b). A continuación, el hielo se propagó al pedicelo izquierdo, mostrando el mismo patrón de congelamiento (INT:  $-4.2^{\circ}\text{C}$ , 1h 12 min, Fig. 3d). Finalmente, el hielo se propagó a los pedicelos centrales ( $-5.3^{\circ}\text{C}$ , 1h 13 min, Fig. 3e). A pesar de que el hielo se propagó hacia todos los pedicelos, no se registró eventos de nucleación en las flores, sólo en los cálices vacíos situados en la parte

inferior de cada inflorescencia. Pasadas 1h 50 minutos de iniciado el experimento de simulación de heladas, se registró una clara diferencia de temperatura entre los pedicelos (-6.2°C) y las flores (-3.8°C) (Fig. A2). Posteriormente, se registraron pequeños eventos de nucleación con un patrón moteado en la parte superior de las inflorescencias (por ejemplo, INT: -7.9°C, 2h 59min, Fig. 3f). Los eventos de nucleación continuaron en los cálices vacíos situados en la parte inferior de cada inflorescencia (por ejemplo, -11.2°C, 3h 29min, Fig. 3f). A pesar de que las flores alcanzaron temperaturas cercanas a los -12°C al final del experimento de simulación de heladas, no se registraron eventos de nucleación en las flores. Las réplicas 2 y 3 mostraron el mismo patrón de congelamiento. el hielo se formó y propagó sin obstáculos a lo largo del pedúnculo (-6.2°C, 56 min y -5.2°C, 56 min, réplica INT 2 y 3 respectivamente) y las hojas (-9.2°C- 1h 18 min y -6.1°C- 1h 5min, réplica INT 2 y 3 respectivamente). Sin embargo, no se registraron eventos de nucleación en las flores.

2.3 *Scyphanthus elegans*: La secuencia de imágenes termográficas en un brote reproductivo de *S. elegans* (Fig. 3a) mostró que la nucleación del hielo ocurrió en el pedúnculo a -4.8°C, 56 minutos después iniciado el experimento de simulación de heladas (Fig. 3b). El hielo se propagó rápidamente a lo largo del pedúnculo hasta la parte interior de la flor (INT: -3.4°C, Fig. 3c). 3 minutos después, se registró un evento de nucleación en una bráctea floral (-8.4°C, Fig. 3d). Los últimos eventos de nucleación, se registraron en los pétalos florales apoyados en la placa (INT: -4.4°C y -5.3°C a 1h y 1h 5 min, respectivamente; Fig. 3e-3f), demostrando que la nucleación del hielo se produjo de forma independiente en cada pétalo. Pasadas 1h

50 minutos de iniciado el experimento de simulación de heladas, las hojas, el pedúnculo y los pétalos, apoyados en la placa, alcanzaron temperaturas similares (temperatura media:  $-10^{\circ}\text{C}$ ; Fig. A2). Aquellas partes de la flor que no estuvieron en contacto directo con la placa alcanzaron temperaturas de  $-3^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente y hasta el final del experimento de simulación de heladas (3h 40min), no se registraron más eventos de nucleación, a pesar de que las partes de la flor que no estaban en contacto directo con la placa alcanzaron temperaturas de  $-11^{\circ}\text{C}$ . Las réplicas 2 y 3 mostraron el mismo patrón de congelamiento. Sólo los pétalos en contacto directo con la placa se congelaron (INT réplica 2:  $-5.8$ , 53 min; réplica 3:  $-8.3^{\circ}\text{C}$ , 1h 4 min).

### 3. Inflorescencia en espiga

3.1 *Lupinus microcarpus*: La secuencia de imágenes termográficas en un brote reproductivo de *L. microcarpus* (Fig. 4a) mostró que la nucleación de hielo ocurrió en la parte inferior del pedúnculo a  $-5.5^{\circ}\text{C}$ , 1h 2 min después de iniciado el experimento de simulación de heladas (Fig. 4b). El hielo se propagó rápidamente a través del pedúnculo hasta llegar a su extremo superior, durante los siguientes 24 segundos (Fig. 4b). Lo anterior refleja que la formación de hielo se produjo sin obstáculos en una secuencia de abajo hacia arriba. Después de que el hielo se propagó a lo largo del pedúnculo, se registraron eventos de nucleación en diferentes flores a lo largo del brote de forma independiente. Las flores más cercanas a la base del pedúnculo fueron las primeras en congelarse (flor izquierda INT:  $-6.4^{\circ}\text{C}$ , 1h 6 min, Fig. 4c y flor derecha INT:  $-6.1^{\circ}\text{C}$ , 1h 7 min, Fig. 4d), seguido por la flor situada justo más arriba (INT:  $-5.2^{\circ}\text{C}$ , 1h 7 min 23s). Posteriormente se registraron eventos de nucleación en las flores situadas en la sección superior del brote reproductivo



(flor izquierda INT:  $-6.3^{\circ}\text{C}$ , 1h 13 min, Fig. 4e y flor derecha INT  $-7.2^{\circ}\text{C}$ , 1h 24 min, Fig. 4f) y en la flor situada justo debajo de éstas (INT:  $-6.4^{\circ}\text{C}$ , 1 h 27 min, Fig. 4g). No se registraron más eventos de nucleación hasta el final del experimento de simulación de heladas (3 h 40 min). La réplica 2, mostró un patrón de congelamiento similar, donde se registraron eventos de nucleación en las flores (por ejemplo, INT:  $-8.1^{\circ}\text{C}$ , 1h 11 min y  $-7.4^{\circ}\text{C}$ , 1h 17 min). Sin embargo, la propagación del hielo no se produjo a través del pedúnculo como en la réplica 1. En la réplica 3, el hielo se propagó desde el pedúnculo hacia los pedicelos (INT:  $-6.3^{\circ}\text{C}$ , 1h 30 min), las hojas (INT medio:  $-8.6 \pm 0.8$ , 1h 29min a 1h 31min) y finalmente a las flores situadas en la parte superior del brote reproductivo (INT:  $-7.7^{\circ}\text{C}$ , 1h 38 min;  $-8.8^{\circ}\text{C}$ , 1h 55 min).

3.2 *Stachys philippiana* (Verticillaster): La secuencia de imágenes termográficas en *S. philippiana* (Fig. 4a) mostró que la nucleación de hielo ocurre en la parte inferior del pedúnculo a  $-5.4^{\circ}\text{C}$ , 41 minutos después de iniciado el experimento de simulación de heladas (Fig. 4c). El hielo se propagó a través del pedúnculo, pero fue frenado por los nódulos florales. Un minuto más tarde, el hielo se propagó por el segundo inter nodo del pedúnculo (INT:  $-4.7^{\circ}\text{C}$ , 42 min, Fig. 4d), sin embargo, el hielo no se propagó hacia la sección superior del pedúnculo. Posteriormente se registraron eventos de nucleación en algunas flores (INT:  $-3.6^{\circ}\text{C}$ , 1h 3 min, Fig. 4e). Las flores se congelaron de manera independiente, incluso en flores de un mismo nódulo. No se registraron eventos de nucleación en brácteas tipo-hoja a pesar de que alcanzaron temperaturas medias de  $-7^{\circ}\text{C}$  pasados 1h 50 min del inicio del experimento de simulación de heladas (Fig. A3). La réplica 2 registró un patrón similar de propagación de hielo. La formación de hielo se produjo a  $-5.7^{\circ}\text{C}$  (40 min)

en la parte inferior del pedúnculo, sin embargo, la propagación del hielo se ralentizó por los nódulos florales, y no se registraron eventos de nucleación en la parte superior del pedúnculo. Posteriormente, se registró un evento de nucleación de hielo en una de las flores a  $-6.1^{\circ}\text{C}$  (1h 30 min). En la réplica 3 la nucleación de hielo se produjo a  $-6.7^{\circ}\text{C}$  en la parte inferior del pedúnculo (1h 8 min), luego la propagación del hielo se ralentizó por los nódulos florales, pero finalmente se propagó en la segunda parte del pedúnculo, sobre el primer nodo floral (INT:  $-6.3$ , 1h 20 min).

#### **4. Inflorescencia en espiguilla**

4.1 *Hordeum comosum*: La secuencia de imágenes termográficas en *H. comosum* (Fig. 5a) muestra que la nucleación del hielo ocurre en una de las flores a  $-7.5^{\circ}\text{C}$ , 1h 26 min después de iniciado el experimento de simulación de heladas (Fig. 5b). A continuación, se registraron múltiples e independientes eventos de nucleación en diferentes flores a lo largo de la espiguilla (INT:  $-7.3^{\circ}\text{C} \pm 0.3$  ES, Fig. 5b-5d), reflejando un patrón moteado. Todas las flores en la espiguilla se congelaron independientemente durante los siguientes 39 minutos (2 horas y 5 minutos). Después de lo cual se registraron múltiples eventos de nucleación en las aristas, en un patrón similar a rayos, pero que va desde la punta de las glumas hasta el ápice de las aristas (Fig. 5f-5g). Los eventos de nucleación tipo-rayo se prolongaron durante los siguientes 40 minutos aproximadamente (2h 45 min). Es importante destacar que las 2 réplicas restantes mostraron exactamente el mismo patrón de congelamiento. donde se registraron múltiples eventos de nucleación en las flores (INT R2:  $-8.4^{\circ}\text{C}$ , 1h 13 min; INT R3:  $-8.7^{\circ}\text{C}$ , 1h 31 min) y en aristas.

## 5. Inflorescencias terminales

5.1 *Collomia biflora* (inflorescencia terminal): La secuencia de imágenes termográficas en un brote reproductivo de *C. biflora* (Fig. 6a) mostró que la nucleación del hielo ocurrió en una hoja a  $-6.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1h 8 min después de iniciado el experimento de simulación de heladas (Fig. 6b). El hielo se propagó inmediatamente desde la hoja hacia el pedúnculo y hacia las demás hojas del brote durante los siguientes 4 minutos (Fig. 6b-6c). Posterior a la nucleación de las hojas, se registró un evento de nucleación de hielo en un capullo floral (INT:  $-4.1^{\circ}\text{C}$  a 1h 32 min; Fig. 6d). En estas estructuras reproductivas se registró un gran evento de nucleación, reflejado en un cambio de coloración intenso (Fig. 6d-6f) y luego un patrón moteado de congelamiento (múltiples y pequeñas eventos de nucleación en cada capullo). Finalmente se registró la nucleación de la flor (INT:  $-5.6^{\circ}\text{C}$  a 1h 36 min; Fig. 6e). Este patrón de congelamiento se mantuvo en las réplicas 2 y 3. Donde la nucleación del hielo ocurrió en las hojas inferiores (réplica 2: INT  $-6.1^{\circ}\text{C}$  a 1h 10 min; réplica 3: INT  $-6.2^{\circ}\text{C}$  a 1h 9min), se propagó hacia el pedúnculo y las hojas y posteriormente se registraron eventos de nucleación en las flores (INT:  $-7.9^{\circ}\text{C}$  (2h) y  $-9.4^{\circ}\text{C}$  (2h 19 min), en la réplica 2 y 3 respectivamente). Solo se registraron eventos de nucleación en botones florales de la réplica 3 (e.g.  $-12.5^{\circ}\text{C}$  a las 2h 40 m).

5.2 *Quinchamalium parviflorum* (inflorescencia terminal): La secuencia de imágenes termográficas en un brote reproductivo *Q. parviflorum* (Fig. 6a) mostró que la nucleación de hielo ocurrió en la parte inferior del tallo a  $-8.3^{\circ}\text{C}$  (R1) y  $-9.1^{\circ}\text{C}$  (R2), 1h 10 min después de iniciado el experimento de simulación de heladas (Fig. 6b-

6d). El hielo se propagó rápidamente a través del tallo y las hojas (INT R2:  $-5.9^{\circ}\text{C}$  a 1h 10 min; Fig. 6d-6e) hasta llegar a la inflorescencia, durante el siguiente minuto (Fig. 6d). Lo que refleja que la formación de hielo se produjo sin obstáculos en una secuencia de abajo hacia arriba. Aunque la propagación del hielo alcanzó los pedicelos y la base de la inflorescencia, no se registró nucleación en las flores tubulares, a pesar de que las flores alcanzaron temperaturas de  $-7.1^{\circ}\text{C} \pm 1.1$ , pasados 1h 50 min (Fig. 16) y  $-16.8 \pm 1.6$  pasados 3h 40 min. Las réplicas 3 y 4 revelaron el mismo patrón de congelamiento. La nucleación de hielo se inició y se propagó a lo largo del tallo (INT R3:  $-7.1^{\circ}\text{C}$ , 56 min. INT R4:  $-5.7^{\circ}\text{C}$ , 56 min) y hojas adyacentes hasta llegar a la inflorescencia, sin registrar eventos de nucleación en flores tubulares.

## 6. Inflorescencia umbela

6.1 *Alstroemeria exerens*: La secuencia de imágenes termográficas de una flor de *A. exerens* (Fig. 7a) mostró que la nucleación del hielo ocurrió a  $-6.2^{\circ}\text{C}$  en uno de los pétalos situados en el extremo derecho de la Fig. 7, 48 minutos después de iniciado el experimento de simulación de heladas (Fig. 7b). Consecutivamente, se congelaron el pétalo central (INT:  $-3.8^{\circ}\text{C}$ , 52 min, Fig. 7c), luego los pétalos izquierdos (INT:  $-6^{\circ}\text{C}$ , 58 min, Fig. 7d) y finalmente el pétalo localizado en la parte delantera de la Fig. 7 (INT:  $-7.8^{\circ}\text{C}$ , 1h 37 min, Fig. 7e). Una vez que todos los pétalos se congelaron independientemente, se registraron eventos de nucleación en los estambres ( $-5.6^{\circ}\text{C}$ , 1h 56 min, Fig. 7f;  $-6.3^{\circ}\text{C}$ , 1h 58 min;  $-7.6^{\circ}\text{C}$ , 2h 13 min, Fig. 7g). Al igual que los pétalos, los estambres se congelaron independientemente. Las réplicas 2 y 3 mostraron un patrón de congelamiento similar, donde la nucleación

se produjo en primer lugar en los pétalos (INT R2:  $-4.6^{\circ}\text{C}$ , 58min;  $-7.6^{\circ}\text{C}$ , 1h 22min. INT R3:  $-6.2^{\circ}\text{C}$ , 1h 58min) y las hojas (INT R2:  $-7.5^{\circ}\text{C}$ , 1h 18min;  $-7.2^{\circ}\text{C}$ , 1h 50min. INT R3:  $-7.2^{\circ}\text{C}$ , 2h 8min) que estaban en contacto directo con la placa. Posterior a estos eventos se registró un patrón moteado de congelamiento (pequeños eventos de nucleación), en aquellos pétalos donde se registró previamente la nucleación del hielo, que se extendieron hasta el final del experimento de simulación de heladas.

6.2 *Sanicula graveolens*: La secuencia de imágenes termográficas en brote reproductivo de *S. graveolens* (Fig. 7a) mostró que la nucleación de hielo ocurrió en la parte inferior del pedúnculo a  $-5.7^{\circ}\text{C}$ , 78 minutos después de iniciado el experimento de simulación de heladas (Fig. 7b). El hielo se propagó rápidamente y sin barreras a lo largo de los pedúnculos (INT:  $-8.13^{\circ}\text{C} \pm 0.3 \text{ ES}$ , Fig. 7c) y de la bráctea tipo-hoja adyacente (INT:  $-10.13^{\circ}\text{C}$ , Fig. 7d) hasta el pedicelo (INT:  $-6.4^{\circ}\text{C}$ ) y la inflorescencia (INT:  $-5.5^{\circ}\text{C} \pm 0.3 \text{ SE}$ , Fig. 7e) en los siguientes segundos, en un patrón de congelamiento tipo-pulso. Posteriormente, se registraron pequeños e independientes eventos de nucleación en flores individuales (INT:  $-11^{\circ}\text{C} \pm 0.3 \text{ ES}$ , Fig. 7f-7g) en un patrón moteado. La réplica 2 mostró el mismo patrón de congelamiento, la propagación del hielo ocurrió desde pedúnculo (INT R2:  $-7.7^{\circ}\text{C}$ , 58 min) hacia el pedicelo y la inflorescencia, donde se registraron eventos de nucleación en las flores individuales (INT:  $-10.4^{\circ}\text{C} \pm 0.7 \text{ ES}$ ).

6.3 *Pozoa coriacea*: La secuencia de imágenes termográficas en un brote reproductivo de *P. coriacea* (Fig. 7a) mostró que la nucleación de hielo ocurrió en la parte inferior del pedúnculo a  $-6.2^{\circ}\text{C}$ , 51 min después de iniciado el experimento de

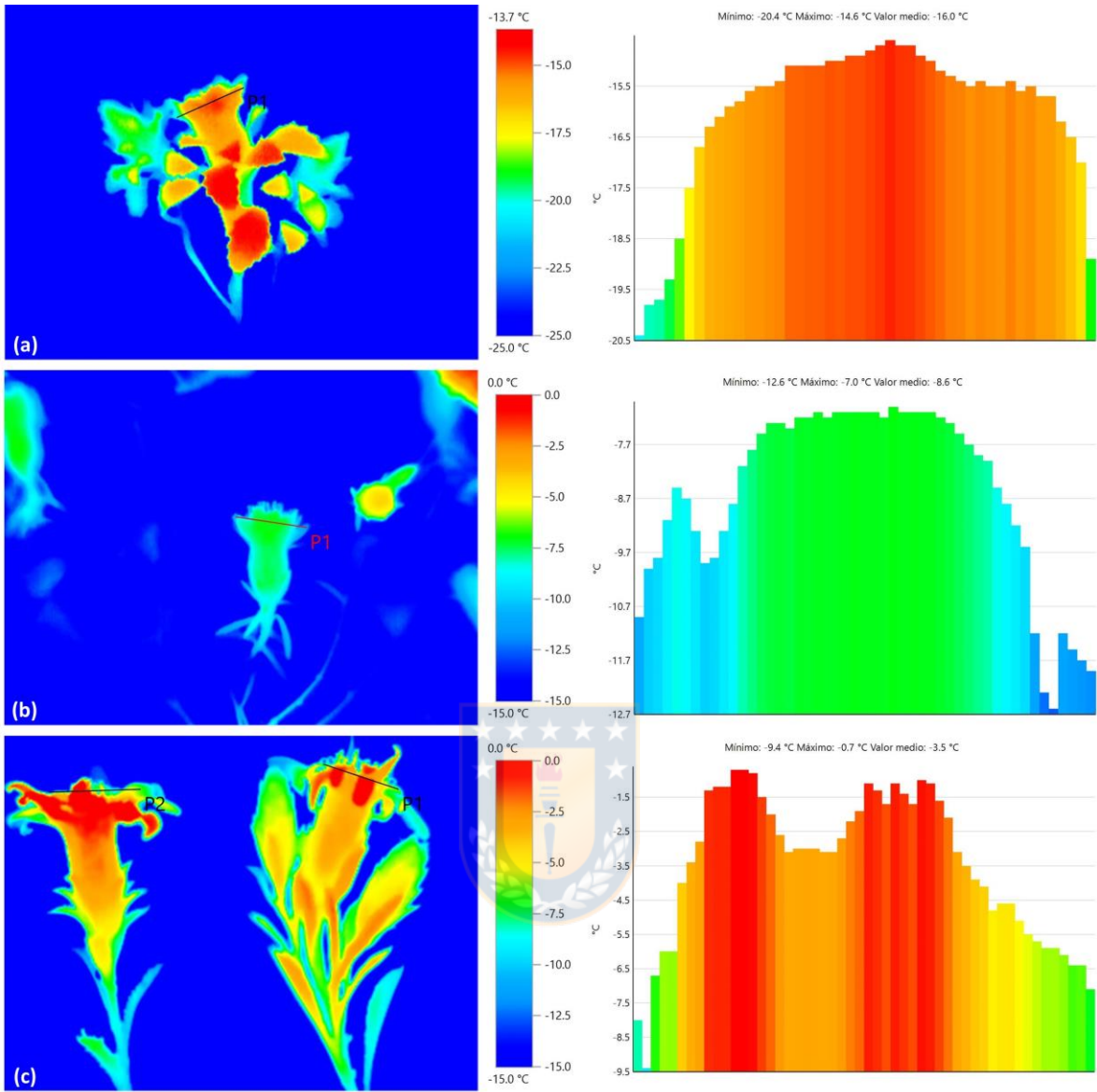
simulación de heladas (Fig. 7b). El hielo se propagó rápidamente hasta llegar a la parte superior del pedúnculo en siguiente segundo (INT:  $-8.3^{\circ}\text{C}$ , Fig. 7c) en un patrón de congelamiento tipo-pulso. A pesar de que la propagación del hielo alcanzó la base de la inflorescencia no se registraron evento de nucleación en las flores hasta 1h 48 min más tarde (INT:  $-8.0^{\circ}\text{C} \pm 0.05 \text{ ES}$ , Fig. 7f). Es importante destacar que a pesar de que la temperatura media de la inflorescencia alcanzó los  $-15.2^{\circ}\text{C}$  pasados 1h 50 de iniciado el experimento (Fig. A6), sólo se registraron eventos de nucleación en unas pocas flores. Las réplicas 2 y 3 mostraron el mismo patrón de congelamiento, donde el hielo se forma y se propaga a través del pedúnculo (INT R2:  $-8.3^{\circ}\text{C}$ , 1h 22s, Fig. 7d; INT R3:  $-7.8^{\circ}\text{C}$ , 1h 43s, Fig. 7e) hasta llegar a la inflorescencia. Sin embargo, en esta réplica los eventos de nucleación en las flores individuales se registraron más de 2 horas más tarde (INT R2:  $-14.5^{\circ}\text{C}$ , INT R3:  $-14.5^{\circ}\text{C}$ ).



**ANEXO 2: Imágenes termográficas capturada a la mitad del experimento de simulación de heladas (1h 50 min) por tipo de inflorescencia.**

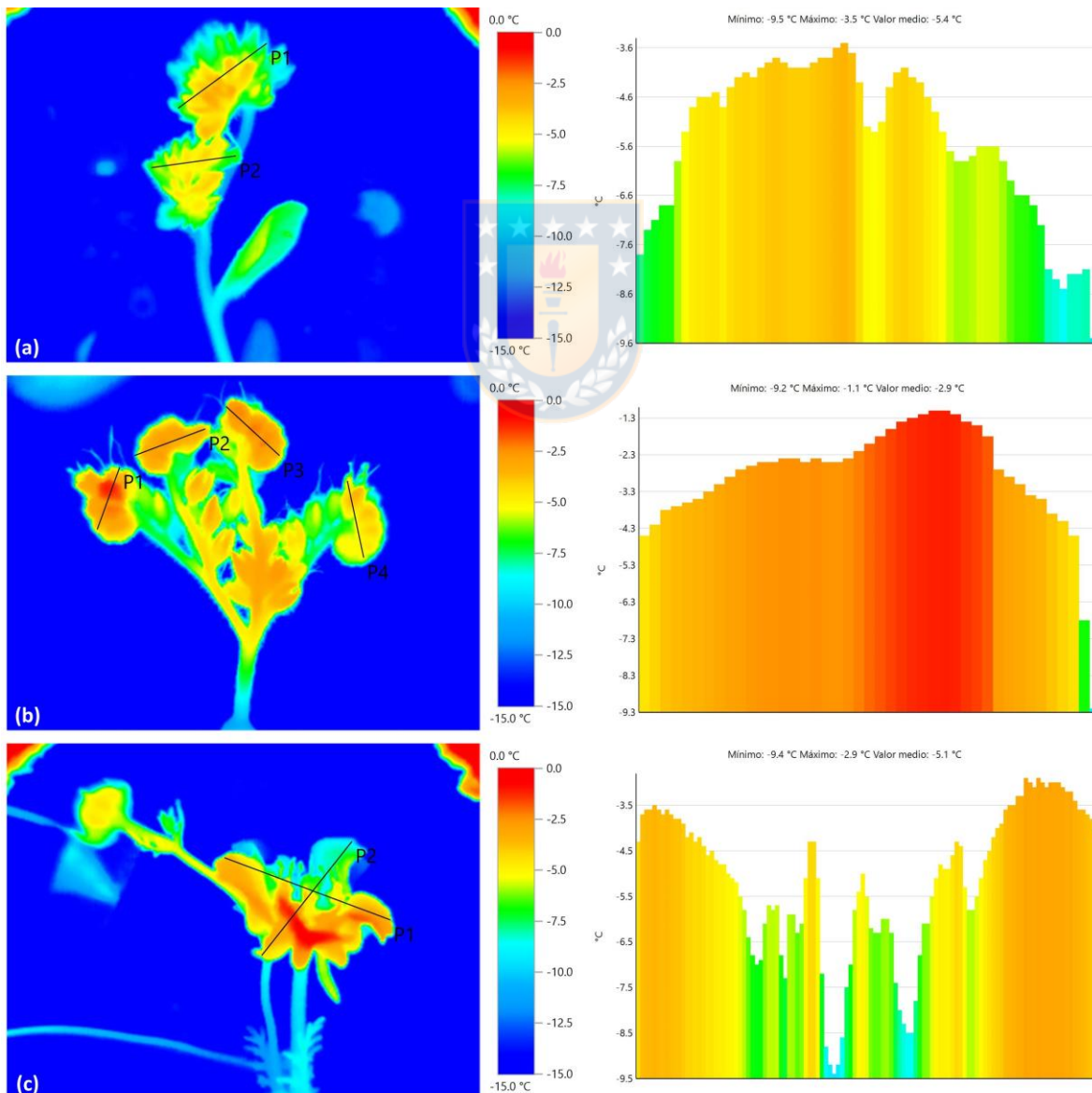
**Fig. A1:** Imagen termográfica capturada a la mitad del experimento de simulación de heladas (1h 50 min) en las especies con inflorescencias tipo capitulo: *Chaetanthera flabellata* **(a)**, *Chaetanthera linearis* **(b)** y *Perezia carthamoides* **(c)**. La barra de colores representa la temperatura en grados Celsius, desde la temperatura más cálida (rojo) a la más fría (azul). La imagen de la derecha representa el perfil de temperatura en la inflorescencia que comprende la porción de trazo (P1) en la imagen izquierda.



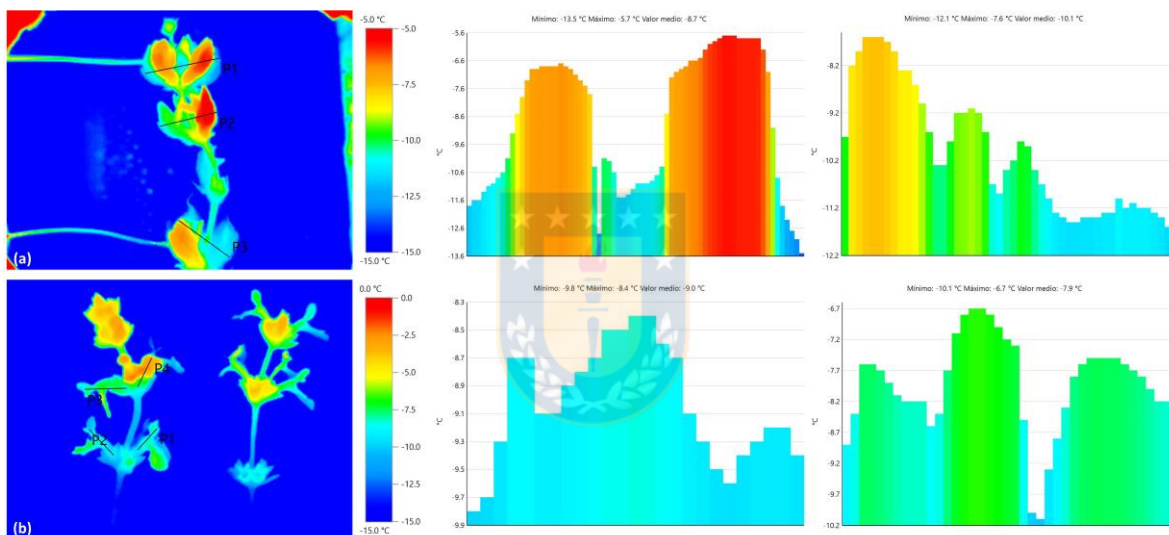




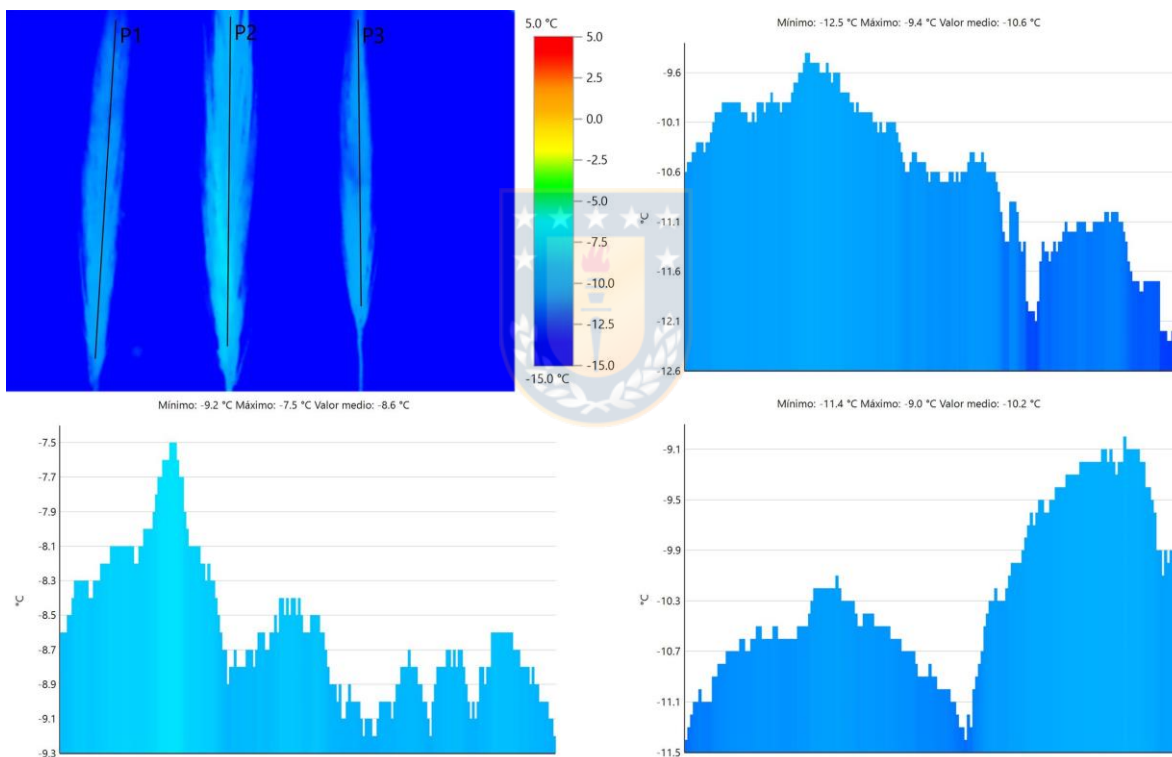
**Fig. A2:** Imagen termográfica capturada a la mitad del experimento de simulación de heladas (1h 50 min) en las especies con inflorescencias tipo cima: *Phacelia brachyantha* (a), *Phacelia secunda* (b) y *scyphanthus elegans* (c). La barra de colores representa la temperatura en grados Celsius, desde la temperatura más cálida (rojo) a la más fría (azul). La imagen de la derecha representa el perfil de temperatura en la inflorescencia que comprende la porción de trazo (P1) en la imagen izquierda.



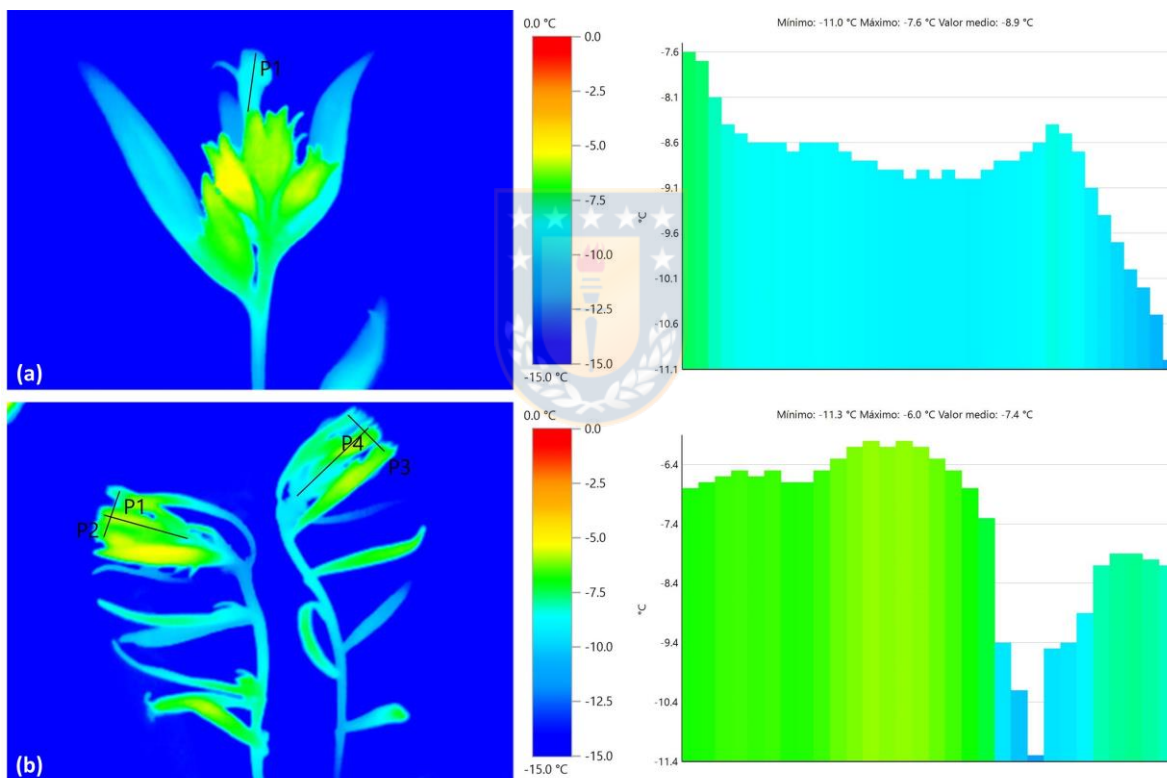
**Fig. A3:** Imagen termográfica capturada a la mitad del experimento de simulación de heladas (1h 50 min) en las especies con inflorescencias tipo espiga: *Lupinus microcarpus*(a), y *Stachys philipianna* (b). La barra de colores representa la temperatura en grados Celsius, desde la temperatura más cálida (rojo) a la más fría (azul). La imagen de la derecha representa el perfil de temperatura en la inflorescencia que comprende la porción de trazo (P1) en la imagen izquierda.



**Fig. A4:** Imagen termográfica capturada a la mitad del experimento de simulación de heladas (1h 50 min) en la especie con inflorescencias tipo espiguilla: *Hordeum comosum*. La barra de colores representa la temperatura en grados Celsius, desde la temperatura más cálida (rojo) a la más fría (azul). La imagen de la derecha representa el perfil de temperatura en la inflorescencia que comprende la porción de trazo (P1) en la imagen izquierda.

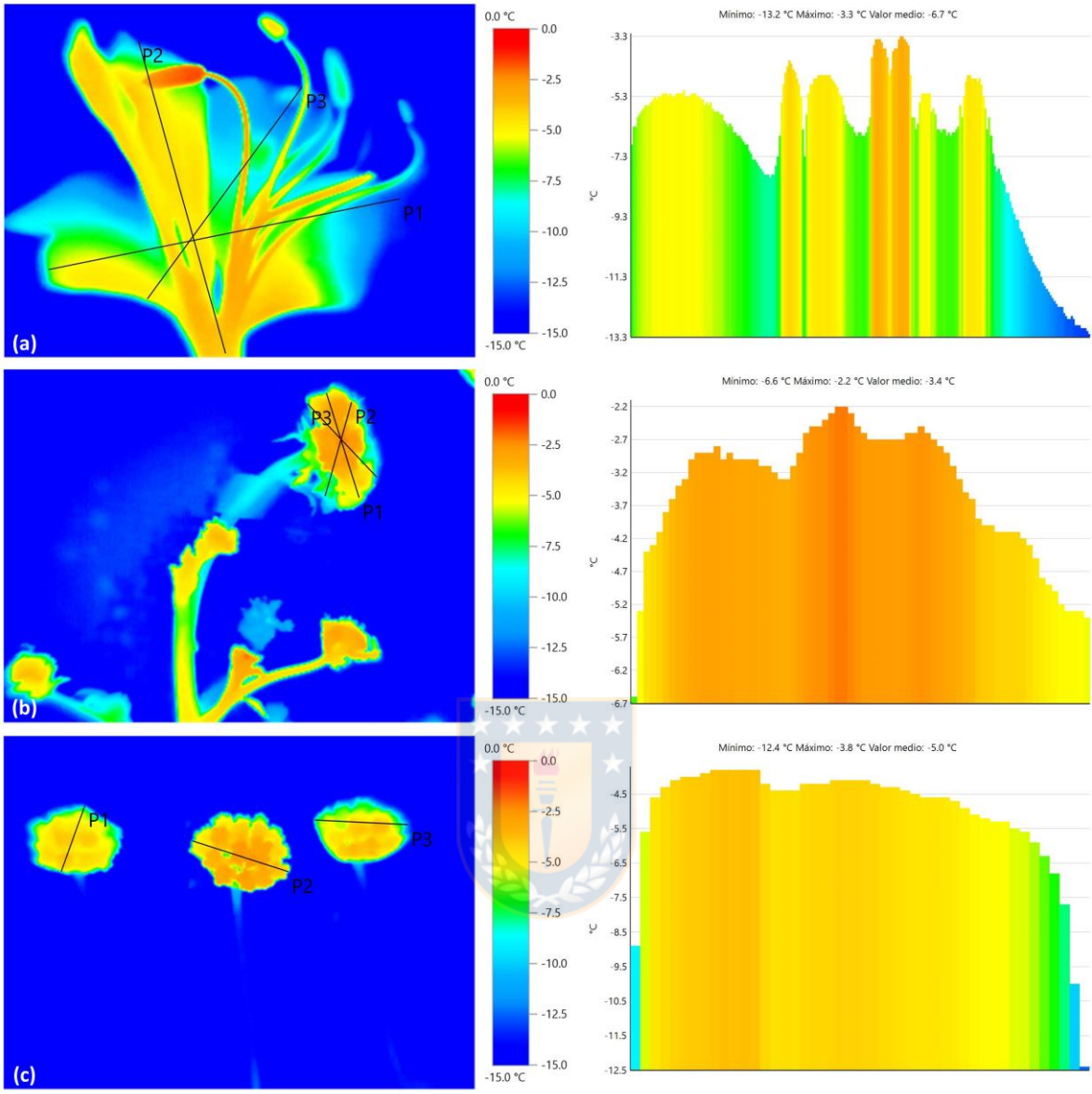


**Fig. A5:** Imagen termográfica capturada a la mitad del experimento de simulación de heladas (1h 50 min) en las especies con inflorescencias tipo terminal: *Collomia biflora* **(a)**, y *Quinchamalium parviflorum* **(b)**. La barra de colores representa la temperatura en grados Celsius, desde la temperatura más cálida (rojo) a la más fría (azul). La imagen de la derecha representa el perfil de temperatura en la inflorescencia que comprende la porción de trazo (P1) en la imagen izquierda.



**Fig. A6:** Imagen termográfica capturada a la mitad del experimento de simulación de heladas (1h 50 min) en las especies con inflorescencias tipo umbela: *Alstroemeria exerens* **(a)**, *Sanicula graveolens* **(b)**, y *Pozoa coriácea* **(c)**. La barra de colores representa la temperatura en grados Celsius, desde la temperatura más cálida (rojo) a la más fría (azul). La imagen de la derecha representa el perfil de temperatura en la inflorescencia que comprende la porción de trazo (P1) en la imagen izquierda.





### ANEXO 3

**Tabla A1: Resultados de la prueba t de Student que compara la tasa de enfriamiento de pedicelos y flores (°C/hora).**

Species	Cooling rate pedicel (°C/hr)	Cooling rate flower (°C*hr)	t-value	d f	p-value	Valid N	Valid N	F-ratio	p-varianza
<b>Annual species</b>									
<i>Chaetanthera flabellata</i>	-3.5 ± 0.5	-3.8 ± 0.1	1.0	4	0.4	3	3	22.0	0.1
<i>Chaetanthera linearis</i>	-5.1 ± 0.4	-4.0 ± 0.9	-1.9	4	0.1	3	3	5.3	0.3
<i>Collomia biflora</i>	-3.2 ± 0.6	-4.7 ± 0.9	2.5	5	0.1	3	4	2.4	0.6
<i>Lupinus microcarpus</i>	-3.1 ± 0.3	-4.3 ± 0.2	6.6	5	<b>0.0</b>	3	4	1.0	0.9
<i>Phacelia brachyantha</i>	-4.5 ± 1.1	-3.2 ± 0.8	-1.3	2	0.3	2	2	2.1	0.8
<i>Quinchamalium parviflorum</i>	-5.4 ± 1.0	-4.8 ± 0.5	-1.0	6	0.4	4	4	5.3	0.2
<i>Scyphanthus elegans</i>	-4.7 ± 0.9	-5.4 ± 0.4	1.1	4	0.3	3	3	6.1	0.3
<b>Perennial species</b>									
<i>Alstroemeria exerens</i>	ND	-4.0 ± 0.5							
<i>Hordeum comosum</i>	ND	-4.5 ± 0.2							
<i>Perezia carthamoides</i>	-4.1 ± 0.8	-5.0 ± 1.0	1.3	3	0.3	3	2	1.6	0.7
<i>Phacelia secunda</i>	-2.7 ± 2.2	-4.1 ± 0.8	1.1	4	0.4	3	3	8.7	0.2
<i>Pozoa coriacea</i>	-4.7 ± 0.6	-3.4 ± 1.7	-1.8	8	0.1	6	4	9.6	0.0
<i>Sanicula graveolens</i>	-3.3 ± 1.2	ND							
<i>Stachys philippiana</i>	-4.4 ± 0.4	-4.4 ± 0.3	0.1	3	0.9	3	2	1.6	1.0

\* ND: no data.

## DISCUSIÓN GENERAL

Las plantas han evolucionado en respuesta al estrés ambiental usando diferentes estrategias que reflejan adaptaciones para maximizar el *fitness* en un ambiente particular (Craine 2009; Grime 1979; Grime & Pierce 2012; Sibly & Calow 1989). Las diferencias interespecíficas en las estrategias de adaptación al estrés se sustentan en los principales marcos ecológicos como el triángulo C-S-R de Grime (1979), la teoría de selección r/K (MacArthur & Wilson 1967; Stearns 1976), el espectro económico foliar (Wright et al. 2008), entre otros (Venable et al. 1992; Westoby 1998; Chave et al. 2009). A pesar de que estas teorías ecológicas se basan en un conjunto de rasgos específicos, todas convergen en un punto: Las plantas tienen recursos limitados para asignar al crecimiento, reproducción y sobrevivencia, por lo tanto, los *trade-offs* existen (Bristiel et al. 2018). Apoyando esta premisa ecológica, nuestros resultados mostraron que existe una estrecha relación entre la estrategia de historia de vida (LHS) y la resistencia al congelamiento, donde las flores y hojas de hierbas perennes fueron más resistentes al congelamiento que las de especies anuales, lo que confirma nuestra hipótesis I. Este patrón de resistencia diferencial entre LHS contrastantes, fue probablemente consecuencia del compromiso que existe entre las altas demandas energéticas asociadas al rápido crecimiento y temprana reproducción de especies anuales y su inversión en estrategias de resistencia al congelamiento. Este hallazgo sugiere que la resistencia al congelamiento es un importante rasgo funcional que podría explicar la restringida distribución altitudinal y, en consecuencia, la menor presencia de las especies anuales en sistemas de alta montaña comparadas con especies perennes (1-2% de



la flora total en áreas de alta montaña son especies anuales: Billings & Mooney 1968; Billings 1974), lo que coincide con estudios previos que reportan una correlación entre la resistencia al congelamiento y la distribución latitudinal (Sakai & Weiser 1973; Larcher & Bauer 1981; Koehler et al. 2012) y altitudinal de las especies (Molina-Montenegro et al. 2012).

La presencia de *trade-offs* fue evidenciada también en el tipo de mecanismos que subyace la resistencia al congelamiento en especies anuales y perennes. Específicamente, aquellas especies anuales que logran habitar a mayores altitudes utilizan principalmente mecanismos de evasión para resistir el congelamiento. Esto se debe posiblemente a que los mecanismos de evasión, los cuales están asociados principalmente a rasgos constitutivos, son menos costosos en términos de energía, lo que disminuye el compromiso entre la resistencia al congelamiento y su rápido crecimiento, evitando además la necesidad de invertir en mecanismos de tolerancia (Kooyers 2015). Contrario a los patrones encontrados en especies anuales, en especies perennes no se encontró un patrón en el tipo de mecanismos de resistencia al congelamiento, ya que ambos mecanismos estuvieron casi igualmente representados en flores y hojas. Por lo tanto, nuestra hipótesis II fue parcialmente validada. Lo anterior refleja que el tipo de mecanismo de resistencia en especies perennes es más flexible, y no depende sólo de la estrategia de historia de vida, sino puede variar, por ejemplo, en respuesta a condiciones ambientales (Sierra-Almeida et al. 2009; Sklenář 2017). Resultados similares, entre la relación de la estrategia de historia de vida y el tipo de mecanismo de resistencia, ha sido previamente reportado en respuesta al estrés hídrico y herbivoría (Kooyers 2015;

Bouزيد et al. 2019; Agrawal et al. 2004). Lo que sugiere que, independiente del tipo de estrés ambiental, las plantas anuales tienden a ser evasoras del estrés, mientras que las especies perennes puede exhibir ambos mecanismos de resistencia.

En términos generales la comparación de la resistencia al congelamiento entre tejidos mostró que, independiente de la LHS, en la mayoría de las especies las flores fueron más sensibles al congelamiento y que el principal mecanismo de resistencia al congelamiento en las flores fue la evasión. Estos resultados coinciden con estudios previos, los cuales han reportado que la formación de hielo en las flores causa daño inmediato (Sakai & Larcher 1987; Neuner et al. 2013; Ladinig et al. 2013; CaraDonna & Bain 2016). Sin embargo, en un alto porcentaje de las especies estudiadas no existieron diferencias entre tejidos o incluso las flores fueron más resistentes al congelamiento que las hojas. En algunas de estas especies la resistencia al congelamiento de las flores fue el resultado de la combinación de mecanismos de evasión, que retrasaron la formación de hielo y mecanismos de tolerancia, que les permitieron a las flores resistir a la formación de hielo. La presencia de patrones alternativos sugiere que la resistencia al congelamiento en flores es una respuesta compleja e integrada de estrategias que puede incluir la fenología, la arquitectura de las plantas, la morfoanatomía y estructura de los tejidos y respuestas a nivel fisiológico, las cuales en conjunto o separadamente puede determinar qué tan resistente al congelamiento son las flores de una especie.

La importancia de los mecanismos estructurales de evasión del congelamiento quedó de manifiesto durante el análisis de los patrones de formación

y propagación de hielo en brotes reproductivos. Contrario a lo predicho en la hipótesis III, la presencia de mecanismos de evasión estructural no depende de la LHS, ya que tanto especies anuales como perennes presentaron BEPH y BTPH, sino depende de la arquitectura, morfología y estructura de estos tejidos. Sin embargo, la relevancia de estos mecanismos de evasión fue mayor en especies anuales que en especies perennes, las cuales, al no ser tolerantes en sus flores dependían completamente de estos mecanismos para evitar el daño por congelamiento. Basados en estos análisis logramos entender además el funcionamiento de estos mecanismos. Por ejemplo, encontramos que la efectividad de las BEPH depende, en la mayoría de los casos, de la presencia de BTPH que impidan que las flores alcancen su temperatura de nucleación, siendo por lo tanto mecanismos complementarios. Adicionalmente los análisis revelaron las limitaciones metodológicas y la cuidadosa interpretación que debe dársele a los datos obtenidos a partir de tejido escindido. Estos datos reflejan la resistencia del tejido en sí, pero obvian una parte importante de la estrategia de las plantas para sobrevivir a eventos de heladas. En este sentido, los análisis termográficos suplen esta necesidad ya que reflejan el efecto de la arquitectura y organización de los tejidos sobre la temperatura a la cual se exponen los diversos órganos de una planta *in situ*. La combinación de ambos tipos de análisis nos permitió poner en perspectiva el funcionamiento integral de estrategias de resistencia al congelamiento desde una mirada *desde afuera hacia adentro*, lo que reveló que la resistencia al congelamiento de una especie, y en especial la de las flores, estaría determinada por diversos mecanismos de evasión y/o tolerancia que actúan de una manera integrada y a distintas escalas de organización.

Lo anterior se ve claramente reflejado en la figura final de la presente tesis (Fig. 14). En esta figura se observa cómo las variables fenología de las especies, resistencia al congelamiento, tipo de mecanismo de resistencia y presencia de mecanismos de evasión estructural (BEPH/BTPH) se integran en una estrategia compleja de resistencia al congelamiento. Esta visión integrada permite crear un diagrama de riesgo de daño por heladas en los tejidos reproductivos el cual evidencia que, para la mayoría de las especies estudiadas, las heladas que ocurren durante la temporada de crecimiento no representan un riesgo real de daño por congelamiento. Donde, aquellas especies con un límite superior de distribución altitudinal (2800+), resisten más y poseen mecanismos de tolerancia al congelamiento en sus flores. Por otra parte, aquellas especies con un límite de distribución altitudinal más restringido (2200-2800), a pesar de presentar mecanismos de evasión, resisten lo suficiente para sobrevivir a eventos extremos de heladas (Tabla S1, Cap. 1). De estas especies, aquellas que concentran su fenología al inicio de la estación de crecimiento resisten más y las que resisten menos, concentran su fenología y, en especial su floración, hacia la mitad de la estación de crecimiento, donde el riesgo de heladas es menor (Fig. 14). Asimismo, algunas de las especies que poseen un menor grado de resistencia al congelamiento en sus flores complementan su estrategia de resistencia a través de la utilización de mecanismos de evasión estructural. Lo anterior refleja claramente que la capacidad que poseen las flores de una especie para resistir temperaturas congelantes viene dada por la armónica coordinación entre el grado de resistencia al congelamiento, su distribución altitudinal y su fenología, lo que sugiere el alto

grado de adaptación de las especies que habitan y son exitosas en ambientes de alta montaña.

De este modo, en la presente tesis se concluye lo siguiente:

- La estrategia de historia de vida determina el grado de resistencia al congelamiento de especies anuales y perennes. En particular, especies perennes son más resistentes al congelamiento que especies anuales, tanto en estructuras vegetativas como reproductivas.
- El principal mecanismo de resistencia al congelamiento en especies anuales es la evasión, mientras que en especies perennes ambos mecanismos pueden estar presentes.
- En la mayoría de las especies, las flores son más sensibles al congelamiento que las hojas y su principal mecanismo de resistencia es la evasión.
- En general, las hojas y flores de una especie exhiben el mismo mecanismo fisiológico de resistencia al congelamiento, lo que sugiere una estrategia común a nivel de planta completa.
- La estrategia de historia de vida (LHS) no determina la presencia de BEPH ni BTPH. La presencia de BTPH depende de la arquitectura y morfología de los brotes reproductivos.
- Los mecanismos de evasión y tolerancia no son excluyentes. La resistencia al congelamiento de las flores es una respuesta compleja e integrada de estrategias que puede incluir la fenología, la arquitectura de las plantas, la

morfoanatomía/estructura de los tejidos y respuestas a nivel fisiológico, las cuales en conjunto o separadamente puede determinar qué tan resistente al congelamiento son las flores de una especie.

### **Significancia y trabajo futuro**

Aunque la conexión entre la estrategia de historia de vida y la estrategia de resistencia al estrés parece intuitiva, y ha sido constantemente hipotetizada dentro de la comunidad de la ecología vegetal, esta asociación rara vez ha sido investigada (Kooyers et al. 2019). En esta tesis, proveemos evidencia de que la estrategia de resistencia al congelamiento se relaciona con la estrategia de historia de vida en especies herbáceas de los Andes de Chile central. Esta tesis representa el primer reporte en el que se muestra simultáneamente el grado de resistencia al congelamiento y el mecanismo subyacente, en flores y hojas de especies anuales y perennes. Nuestros resultados evidencian que la capacidad de los tejidos reproductivos para resistir temperaturas congelantes es una respuesta compleja, la cual integra variables a distinta escala de organización como: la fisiología, arquitectura, morfología, fenología y distribución altitudinal. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de utilizar metodologías integrativas que nos permitan obtener una visión lo más cercana posible a la realidad, y de esta manera tomar decisiones de manejo y/o protección efectivas. A pesar de los avances realizados en esta tesis, aún existe la necesidad de entender en profundidad los factores que determinan la capacidad de los tejidos reproductivos para resistir al congelamiento. Desde una mirada desde afuera hacia dentro, quedan muchas interrogantes acerca

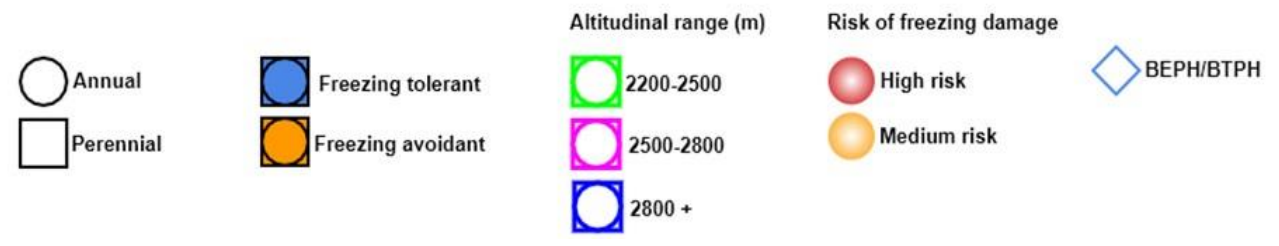
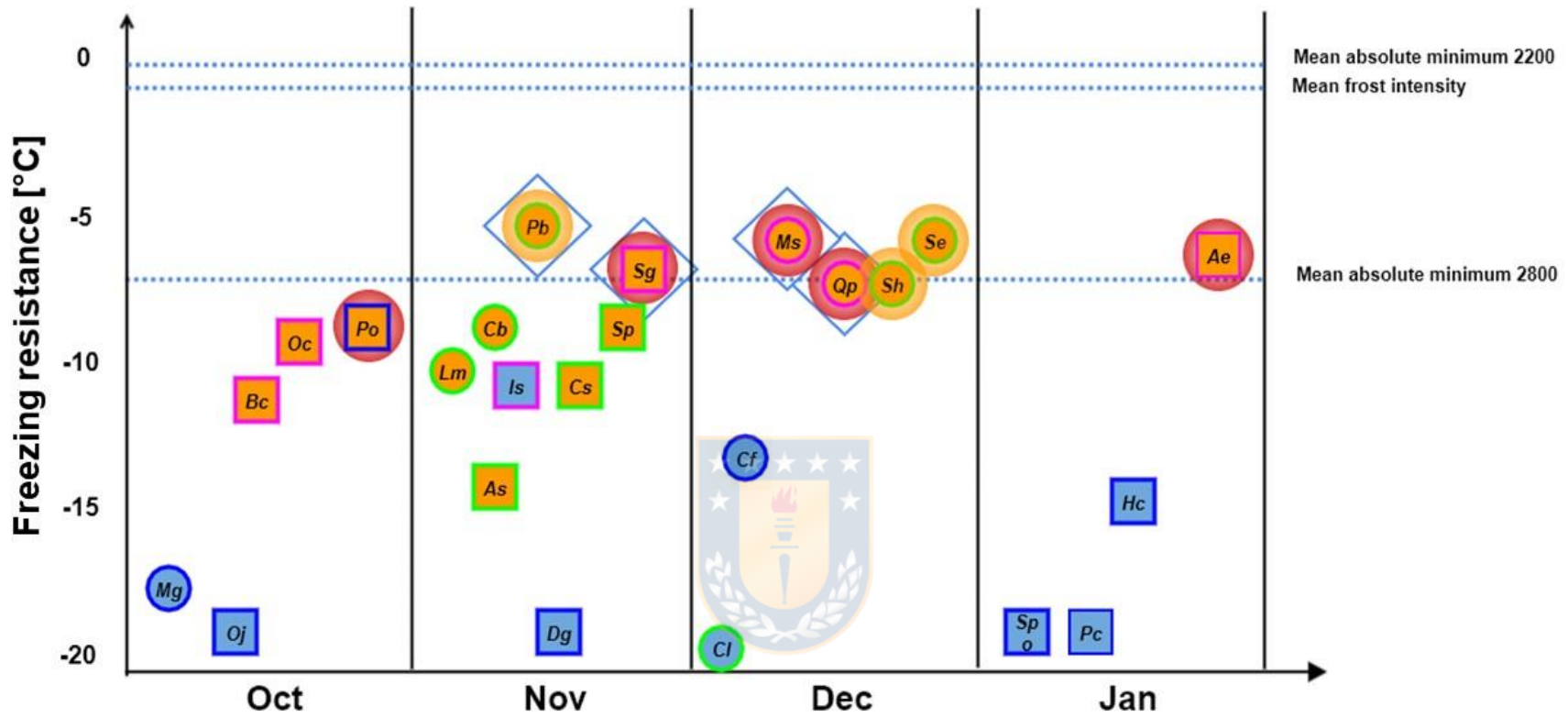
de los mecanismos fisiológicos que subyacen estas respuestas, específicamente: cuáles son los mecanismos de tolerancia en las flores, cuál es la capacidad de adaptación de estos mecanismos frente a variables ambientales y cómo la estrategia de historia de vida puede facilitar o limitar estas respuestas. Responder estas interrogantes nos permitiría entender y/o predecir la capacidad de adaptación de las especies frente a un escenario de cambio climático. Lo anterior, podría ser particularmente importante en especies anuales, las cuales se ha demostrado, son más sensibles al daño por congelamiento que las especies perennes y, pese a ello, son abundantes en este sistema único de alta montaña, los *Andes de Chile central*.



**Fig. 14** Esquema integrativo de las variables: resistencia al congelamiento de estructuras reproductivas, mecanismos de resistencia al congelamiento, fenología y altitud. Especies anuales (círculos): **Cb** *Collomia biflora*, **Cf** *Chaetanthera flabellata*, **Cl** *Chaetanthera linearis*, **Lm** *Lupinus microcarpus*, **Mg** *Microsteris gracilis*, **Ms** *Madia sativa*, **Pb** *Phacelia brachyantha*, **Qp** *Quinchamalium parviflorum*, **Se** *Scyphanthus elegans*, **Sh** *Schizanthus hookeri*. Especies perennes (cuadrados): **Ae**, *Alstroemeria exerens*, **As** *Acaena splendens*, **Bc** *Barneoudia chilensis*, **Cs** *Calceolaria segethii*, **Dg** *Draba gilliesii*, **Hc** *Hordeum comosum*, **Is** *Ipheion sessile*, **Oj** *Olsynium junceum*, **Oc** *Oxalis cinerea*, **Pc** *Perezia carthamoides*, **Ph** *Poa holciformis*, **Sg** *Sanicula graveolens*, **Sp** *Stachys philippiana* y **Spo** *Senecio polygaloides*







## REFERENCIAS GENERALES

Agrawal AA, Conner JK, Stinchcombe JR (2004) Evolution of plant resistance and tolerance to frost damage. *Ecol Lett* 7:1199–1208

Arroyo MTK, Armesto JJ, Villagrán C (1981) Plant phenological patterns in the high Andean Cordillera of central Chile. *J Ecol* 69:205–223

Arroyo MTK, Armesto JJ, Primack RB (1985) Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of central Chile II. Effect of temperature on visitation rates and pollination possibilities. *Plant Syst Evol* 149(3-4):187-203

Ashworth EN (1984) Xylem development in *Prunus* flower buds and the relationship to deep supercooling. *Plant physiol* 74(4):862-865.

Augsburger CK (2009) Spring 2007 warmth and frost: phenology, damage and refoliation in a temperate deciduous forest. *Funct Ecol* 23:1031–1039

Bannister P (2005) Frost resistance of the New Zealand narrow-leaved snow tussock grass, *Chionochloa rigida*. *N Z J Bot* 43:425–430

Bazzaz FA, Chiariello NR, Coley PD, Pitelka LF (1987) Allocating resources to reproduction and defense. *Bioscience* 37:58–67

Bazzaz FA, Morse FBS (1991) Annual plants: potential responses to multiple stresses. In: Mooney HA, Winner WE, Pell EJ (eds) *Response of plants to multiple stresses*. Academic Press, San Diego, pp 283–305

Billings WD (1974) Arctic and alpine vegetation: plant adaptations to cold summer climates. In: Ives JD, Barry RG (eds) *Arctic and alpine environments*. Methuen, London, pp 403–443

Billings WD, Mooney HA (1968) The ecology of arctic and alpine plants. *Biol Rev* 43:481–529

Bokhorst S, Bjerke JW, Bowles FW, Melillo J, Callaghan TV, Phoenix GK (2008) Impacts of extreme winter warming in the sub-Arctic: growing season responses of dwarf shrub heathland. *Glob Chang Biol* 14:2603–2612

Bouzig M, He F, Schmitz G, Häusler RE, Weber APM, Mettler-Altmann T, De Meaux J (2019) *Arabidopsis* species deploy distinct strategies to cope with drought stress. *Ann Bot* 124:27–40

Bristiel P, Gillespie L, Østrem L, Balachowski J, Violle C, Voltaire F (2018) Experimental evaluation of the robustness of the growth–stress tolerance trade-off within the perennial grass *Dactylis glomerata*. *Funct Ecol* 32(8):1944-1958

Bucher SF, Feiler R, Buchner O, Neuner G, Rosbakh S, Leiterer M, Römermann C (2019) Temporal and spatial trade-offs between resistance and performance traits in herbaceous plant species. *Environ Exp Bot* 157:187–196

- CaraDonna PJ, Bain JA (2016) Frost sensitivity of leaves and flowers of subalpine plants is related to tissue type and phenology. *J Ecol* 104:55–64
- Chave J, Coomes D, Jansen S, Lewis SL, Swenson NG, Zanne AE (2009) Towards a worldwide wood economics spectrum. *Ecology letters* 12(4):351-366
- Craine JM (2009) Resource strategies of wild plants. Princeton, NJ: Princeton University Press. <https://doi.org/10.1515/9781400830640>
- Dumlao MR, Darehshouri A, Cohu CM, Muller O, Mathias J, Adams WW III, Demmig-Adams B (2012) Low temperature acclimation of photosynthetic capacity and leaf morphology in the context of phloem loading type. *Photosyn Res* 113:81–189
- Fuller MP, Wisniewski M (1998) The use of infrared thermal imaging in the study of ice nucleation and freezing of plants. *J Therm Biol* 23(2): 81-89
- Garnier E (1992) Growth analysis of congeneric annual and perennial grass species. *J Ecol* 80:665–675
- Gerdol R, Siffi C, Iacumin P, Gualmini M, Tomaselli M (2013) Advanced snowmelt affects vegetative growth and sexual reproduction of *Vaccinium myrtillus* in a sub-alpine heath. *J Veg Sci* 24:569–579
- Goldstein G, Rada F, Azócar A (1985) Cold hardiness and supercooling along an altitudinal gradient in Andean giant rosette species. *Oecologia* 68:147–152
- Grime JP (1979) Plant strategies and vegetation processes. Chichester, UK: Wiley.
- Grime JP, Pierce S (2012) The evolutionary strategies that shape ecosystems. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118223246>
- Gusta LV, Wisniewski M (2013) Understanding plant cold hardiness: an opinion. *Physiol Plant* 147:4–14
- Hacker J, Neuner G (2007) Ice propagation in plants visualized at the tissue level by infrared differential thermal analysis (IDTA). *Tree physiol* 27(12):1661-1670.
- Hacker J, Neuner G (2008) Ice propagation in dehardened alpine plant species studied by infrared differential thermal analysis (IDTA). *Arct Antarct Alp Res* 40:660–670
- Hacker J, Spindelböck J, Neuner G (2008) Mesophyll freezing and effects of freeze dehydration visualized by simultaneous measurement of IDTA and differential imaging chlorophyll fluorescence. *Plant Cell Environ* 31:1725–1733
- Hacker J, Ladinig U, Wagner J, Neuner G (2011) Inflorescences of alpine cushion plants freeze autonomously and may survive subzero temperatures by supercooling. *Plant Sci* 180:149–156
- Hancock JF, Pritts MP (1987) Does reproductive effort vary across different life forms and seral environments? A review of the literature. *Bull Torrey Bot Club* 114:53–59

- Hekneby M, Antolín MC, Sánchez-Díaz M (2006) Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes. *Environ Exp Bot* 55:305–314
- Hughes MA, Dunn MA (1996) The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J Exp Bot* 47:291–305
- Inouye DW (2000) The ecological and evolutionary significance of frost in the context of climate change. *Ecology Letters* 3(5):457-463
- Inouye DW, Morales MA, Dodge GJ (2002) Variation in timing and abundance of flowering by *Delphinium barbeyi* Huth (Ranunculaceae): the roles of snowpack, frost, and La Nina, in the context of climate change. *Oecologia* 130(4):543-550
- Inouye DW (2008) Effects of climate change on phenology, frost damage, and floral abundance of montane wildflowers. *Ecology* 89:353–362
- Ishikawa M, Sakai A (1981) Freezing avoidance mechanisms by supercooling in some rhododendron flower buds with reference to water relations. *Plant Cell Physiol* 22(6): 953–967
- Koehler K, Center A, Cavender-Bares J (2012) Evidence for a freezing tolerance-growth rate trade-off in the live oaks (*Quercus series Virentes*) across the tropical-temperate divide. *New Phytol* 193:730–744.
- Kooyers NJ (2015) The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. *Plant Sci* 234:155–162
- Körner C (2003) Alpine plant life: functional plant ecology of high mountain ecosystems; with 47 tables, 2nd edn. Springer-Verlag, Berlin
- Körner C, Alsos IG (2009) Freezing resistance in high arctic plant species of Svalbard in mid-summer. *Bauhinia* 21:25–32
- Kuprian E, Briceño VF, Wagner J, Neuner G (2014) Ice barriers promote supercooling and prevent frost injury in reproductive buds, flowers and fruits of alpine dwarf shrubs throughout the summer. *Environ Exp Bot* 106:4–12
- Kuprian E, Tuong TD, Pfaller K, Wagner J, Livingston III DP, Neuner G (2016) Persistent Supercooling of Reproductive Shoots Is Enabled by Structural Ice Barriers Being Active Despite an Intact Xylem Connection. *PloS one* 11(9): e0163160.
- Ladinig U, Hacker J, Neuner G, Wagner J (2013) How endangered is sexual reproduction of high-mountain plants by summer frosts? Frost resistance, frequency of frost events and risk assessment. *Oecologia* 171:743–760
- Larcher W, Bauer H (1981) Ecological significance of resistance to low temperature. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H, eds. *Physiological plant ecology. I. Response to the physical environment*. New York, NY, USA: Springer-Verlag, 403–407.

Larcher W (1982) Typology of freezing phenomena among vascular plants and evolutionary trends in frost acclimation. In *Plant Cold Hardiness and Freezing Stress* (eds A. Sakai & P.H. Li), pp. 417–426. Academic Press, New York.

Larcher W, Wagner J (2009) High mountain bioclimate: temperatures near the ground recorded from the timberline to the nival zone in the central Alps. *Contributions to Natural History* 12:857-874

Larcher W, Kainmüller C, Wagner J (2010) Survival types of high mountain plants under extreme temperatures. *Flora* 205:3–18

Lenz A, Hoch G, Vitasse Y, Körner C (2013) European deciduous trees exhibit similar safety margins against damage by spring freeze events along elevational gradients. *New Phytol* 200:1166–1175

Levitt J (1980) Responses of plants to environmental stress, vol. 1: Chilling, freezing, and high temperature stresses. Academic Press, NY, USA.

Loehle C (1998) Height growth tradeoffs determine northern and southern range limits for trees. *J Biogeogr* 25:735–742

Loik ME, Still C, Huxman T, Harte J (2004) In situ photosynthetic freezing tolerance for plants exposed to a global warming manipulation in the Rocky Mountains, Colorado, USA. *New Phytol* 162:331–341

MacArthur RH, Wilson EO (1967) *The theory of island biogeography*. Princeton, NJ: Princeton University Press.

MacArthur RH (1972) *Patterns in the distribution of species*. New York, NY, USA: Harper & Row Publisher, Inc.

Molina-Montenegro MA, Gallardo-Cerda J, Flores TSM, Atala C (2012). The trade-off between cold resistance and growth determines the *Nothofagus pumilio* treeline. *Plant Ecol* 213:133–142. <https://doi.org/10.1007/s11258-011-9964-5>

Neuner G, Beikircher B (2010) Critically reduced frost resistance of *Picea abies* during sprouting could be linked to cytological changes. *Protoplasma* 243:145–152

Neuner G, Eler A, Ladinig U, Hacker J, Wagner J (2013) Frost resistance of reproductive tissues during various stages of development in high mountain plants. *Physiol Plant* 147:88–100

Nobel PS, Smith SD (1983) High and low temperature tolerances and their relationships to distribution of agaves. *Plant Cell Environ* 6(9): 711-719

Pacheco DA, Dudley LS, Cabezas J, Cavieres LA, Arroyo MTK (2016) Plastic responses contribute to explaining altitudinal and temporal variation in potential flower longevity in high Andean *Rhodolirion montanum*. *PLoS One*, 11: e0166350. <http://doi:10.1371/journal.pone.0166350>

Pescador DS, Sierra-Almeida A, Torres PJ, Escudero A (2016) Summer freezing resistance: a critical filter for plant community assemblies in Mediterranean High-mountains. *Front Plant Sci* 7:197. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00194>

Quamme HA (1978) Mechanism of supercooling in overwintering peach flower buds. *J Amer Soc Hort Sci* 103:59-61

Quamme HA, Su WA, Veto L J (1995) Anatomical features facilitating supercooling of the flower within the dormant peach flower bud. *J Amer Soc Hort Sci* 120(5): 814-822

Rada F, Goldstein G, Azocar A, Meinzer F (1985) Freezing avoidance in Andean giant rosette plants. *Plant Cell Environ* 8:501–507. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1985.tb01685.x>

Rada F, Goldstein G, Azocar A, Torres F (1987) Supercooling along an altitudinal gradient in *Espeletia schultzii*, a caulescent giant rosette species. *Environ Exp Bot* 38:491–497

Reinhardt D, Kuhlemeier C (2002) Plant architecture. *EMBO reports* 3(9):846-851

Rixen C, Dawes MA, Wipf S, Hagedorn F (2012) Evidence of enhanced freezing damage in treeline plants during six years of CO<sub>2</sub> enrichment and soil warming. *Oikos* 121:1532–1543

Sakai A, Otsuka K (1970) Freezing resistance of alpine plants. *Ecology* 51:665–671

Sakai A, Weiser CJ (1973) Freezing resistance of trees in North America with reference to tree regions. *Ecology* 54:118–126

Sakai A, Larcher W (1987) Frost survival of plants: responses and adaptation to freezing stress. Springer-Verlag, Berlin

Savage JA, Cavender-Bares J (2013). Phenological cues drive an apparent trade-off between freezing tolerance and growth in the family Salicaceae. *Ecology* 94: 1708–1717. <https://doi.org/10.1890/12-1779.1>

Sibly R, Calow P (1989) A life-cycle theory of responses to stress. *Biol J Linn Soc Lond* 37:101–116. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1989.tb02007.x>

Sierra-Almeida A, Cavieres LA, Bravo LA (2009) Freezing resistance varies within the growing season and with the elevation in high-Andean species of central Chile. *New Phytol* 182:461–469

Sierra-Almeida A, Cavieres LA, Bravo LA (2010) Freezing resistance of high elevation plant species is not related to their height or growth-form in the central Chilean Andes. *Environ Exp Bot* 69:273–278

Sierra-Almeida A, Cavieres LA (2012) Summer freezing resistance of high-elevation plant species changes with ontogeny. *Environ Exp Bot* 80:10–15



Sierra-Almeida A, Reyes-Bahamonde C, Cavieres LA (2016) Drought increases the freezing resistance of high-elevation plants of the central Chilean Andes. *Oecologia* 181:1011–1023

Sklenář P (2017) Seasonal variation of freezing resistance mechanisms in north temperate alpine plants. *Alp Bot* 127:31–39

Sklenář P, Kucerova A, Macek P, Mackova J (2010) Does plant height determine the freezing resistance in the páramo plants? *Austral Ecol* 35:929–934

Smith AP (1974) Bud Temperature in Relation to Nyctinastic Leaf Movement in an Andean Giant Rosette Plant. *Biotropica* 6: 263–266.  
<https://doi.org/10.2307/2989670>.

Smith AP (1979) Function of Dead Leaves in *Espeletia schultzii* (Compositae), and Andean Caulescent Rosette Species. *Biotropica* 11: 43–47.  
<https://doi.org/10.2307/2388171>

Squeo FA, Rada F, García C, Ponce M, Rojas A, Azócar A (1996) Cold resistance mechanisms in high desert Andean plants. *Oecologia* 105:552–555

Stearns, S. C. (1976). Life-history tactics: A review of the ideas. *The Quarterly Review of Biology*, 51, 3–47. <https://doi.org/10.1086/409052>

Strand Å, Foyer CH, Gustafsson P, Gardeström P, Hurry V (2003) Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant Cell Environ* 26:523–535

Taschler D, Neuner G (2004) Summer frost resistance and freezing patterns measured in situ in leaves of major alpine plant growth forms in relation to their upper distribution boundary. *Plant Cell Environ* 27:737–746

Thomashow MF (2010) Molecular basis of plant cold acclimation: insights gained from studying the CBF cold response pathway. *Plant Physiol* 154(2):571–577

Torres-Díaz C, Gómez-González S, Stotz GC, Torres-Morales P, Paredes B, Pérez-Millaqueo M, Gianoli E (2011) Extremely long-lived stigmas allow extended cross-pollination opportunities in a High Andean plant. *PLoS One* 6: e19497.  
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0019497>

Uemura M, Steponkus P (1994) A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. *Plant Physiol* 104:479–496

Venable DL (1992) Size-number trade-offs and the variation of seed size with plant resource status. *Am Nat* 140(2): 287-304

Venn SE, Morgan JW, Lord JM (2013) Foliar freezing resistance of Australian alpine plants over the growing season. *Austral Ecol* 38:152–161

Vitasse Y, Lenz A, Körner C (2014) The interaction between freezing tolerance and phenology in temperate deciduous trees. *Front Plant Sci* 5:541. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00541>

Westoby M (1998) A leaf-height-seed (LHS) plant ecology strategy scheme. *Plant Soil* 199:213–227. <https://doi.org/10.1023/A:1004327224729>

Wheeler JA, Hoch G, Cortés AJ, Sedlacek J, Wipf S, Rixen C (2014) Increased spring freezing vulnerability for alpine shrubs under early snowmelt. *Oecologia*, 175(1):219-229

Wingler A (2015) Comparison of signalling interactions determining annual and perennial plant growth in response to low temperature. *Front Plant Sci* 5:794. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00794>

Wisniewski ME, Gusta LV, Fuller MP, Karlson D (2009) Ice nucleation, propagation and deep supercooling: the lost tribes of freezing studies. *Plant Cold Hardiness: from the laboratory to the field*, pp. 1-11

Wisniewski ME, Gusta LV, Neuner G (2014) Adaptive mechanisms of freeze avoidance in plants: A brief update. *Environ Exp Bot* 99:133–140

Woodward FI, Pigott CD. 1975. Climatic control of altitudinal distribution of *Sedum rosea* (L.) Scop and *Sedum telephium* L. 1. Field observations. *New Phytol* 74:323–334

Workmaster BA, Palta JP, Wisniewski M (1999) Ice nucleation and propagation in cranberry uprights and fruit using infrared thermography. *J Am Soc Hortic Sci* 124: 619–625.

Wright IJ, Reich PB, Westoby M, Ackerly DD, Baruch Z, Bongers F, Cavender-Bares J, Chapin T, Cornelissen JHC, Diemer M, Flexas J, Garnier E, Groom PK, Gulias J, Hikosaka K, Lamont BB, Lee T, Lee W, Lusk C, Midgley JJ, Navas M-L, Niinemets, Ü, Oleksyn J, Osada N, Poorter H, Poot P, Prior L, Yankov VI, Roumet C, Thomas, SC, Tjoelker MG, Veneklaas EJ, Villar R (2004) The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* 428: 821–827