



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
BIOLOGÍA

Análisis morfométrico de tépalos para la delimitación de entidades del complejo *Alstroemeria hookeri* Lodd.

Tesis para optar al título profesional de Bióloga.

ANDREA FERNANDA RUIZ LOZANO

Profesor Guía: Dr. Óscar Toro Núñez

Concepción, Chile 2023.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen	5
Abstract	6
Introducción	7
Delimitación de identidades	7
Complejos de especie taxonómicos	8
Morfometría geométrica y Elipses de Fourier	9
<i>Alstroemeria</i>	11
El complejo <i>Alstroemeria hookeri</i>	12
Contexto	19
Hipótesis	20
Objetivos	20
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
Metodología	21
Preparación del material	21
Digitalización	21
Estandarización	22
Registro de formas vía descomposición elíptica de Fourier.	23
Análisis Estadísticos	24
Resultados	25
Análisis de descomposición de elípticos de Fourier	25
Análisis de componentes principales	26
Análisis estadístico multivariado	27
Análisis discriminante lineal (LDA)	31
Análisis de validación cruzada	32
Medidas escalares	35
Prueba no-paramétrica	38
Dunn-test más corrección de Bonferroni	38
Análisis no supervisado basado en mixturas Gaussianas	43
Discusión	46
Conclusión	50
Referencias	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Números de armónicos de cada grupo de tépalos según su representatividad.	26
Tabla 2. Resultados del Análisis estadísticos multivariados para cada set de datos donde el valor p muestra la significancia.	28
Tabla 3	
3a. Tabla resumen de valor-p para CTIE	29
3b. Tabla resumen de valor-p para CTII.	29
3c. Tabla resumen de valor-p para CTSE.	30
3d. Tabla resumen de valor-p para CTSI.	30
Tabla 4. Resumen del Análisis de validación cruzada expresados en porcentajes de predictibilidad en cada grupo de tépalo.	33
Tabla 5. Resumen de resultados de la prueba estadística Kruskall-Wallis.	38
Tabla 6	
6a. Diferencias en las combinaciones de área/perímetro para ATIE.	39
6b. Diferencias en las combinaciones de área/perímetro para ATII.	39
6c. Diferencias en las combinaciones de área/perímetro para ATSE.	40
6d. Diferencias en las combinaciones de área/perímetro para ATSI.	40
Tabla 7	
7a. Diferencias en las combinaciones de largo/ancho para ATIE.	41
7b. Diferencias en las combinaciones de largo/ancho para ATII.	41
7c. Diferencias en las combinaciones de largo/ancho para ATSE.	42
7d. Diferencias en las combinaciones de largo/ancho para ATSI.	42
Tabla 8. Resumen de los componentes usados para el análisis no supervisado.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Distribución geográfica de las poblaciones del complejo <i>Alstroemeria hookeri</i> y las especies <i>A. cummingiana</i> y <i>A. marticorenae</i> .	13
Figura 2.- Referencia de ejemplar de <i>A. cummingiana</i> .	14
Figura 3.- Referencia de ejemplar de <i>A. marticorenae</i> .	15
Figura 4.- Referencia de ejemplar de <i>A. hookeri</i> subsp. <i>hookeri</i> .	16
Figura 5.- Referencia de ejemplar de <i>A. hookeri</i> subsp. <i>sansebastiana</i> .	17
Figura 6.- Referencia de ejemplar de <i>A. hookeri</i> subsp. <i>recumbens</i>	18
Figura 7.- Referencia de ejemplar de <i>A. hookeri</i> subsp. <i>maculata</i> .	18
Figura 8.- Posición de los <i>landmarks</i> en los tépalos evaluados.	23
Figura 9. Proporción de los distintos componentes retenidos para cada grupo de tépalos.	26
Figura 10. Análisis de componentes principales para cada grupo de tépalo en el morfoespacio visualizando el ordenamiento de los dos primeros componentes.	27
Figura 11. Esquema del Análisis linear discriminante ocupando los componentes principales.	32
Figura 12	
12a. Gráfico de predictibilidad del Análisis de validación cruzada para CTIE.	33
12b. Gráfico de predictibilidad del Análisis de validación cruzada para CTII.	34
12c. Gráfico de predictibilidad del Análisis de validación cruzada para CTSE.	34
12d. Gráfico de predictibilidad del Análisis de validación cruzada para CTSI.	35
Figura 13. Diagrama de medidas de área/perímetro (AP) para los cuatro tépalos.	36
Figura 14. Diagrama de medidas de largo/ancho (LW) para los cuatro tépalos.	37
Figura 15	
15a. Gráfico de predicción no supervisada para CTIE.	44
15b. Gráfico de predicción no supervisada para CTII.	44
15c. Gráfico de predicción no supervisada para CTSE.	45
15d. Gráfico de predicción no supervisada para CTSI.	45

Resumen

El género *Alstroemeria* está compuesto por alrededor de 90 especies. De estos, cerca de 57 taxones se han descrito para Chile, distribuidos en 39 especies, 10 subespecies y 8 variedades. De las 39 especies descritas para Chile un 28% corresponde a complejos de especies. Estos grupos son un desafío persistente para el establecimiento de propuestas taxonómicas robustas, dado que la gran variabilidad de sus caracteres fenotípicos impide determinar criterios objetivos de delimitación. Por lo mismo, la exploración de aproximaciones cuantitativas podría ayudar a resolver las actuales hipótesis de delimitación, particularmente con el uso de métodos de morfometría geométrica soportados en test estadísticos explícitos de diferenciación. Actualmente, el complejo *Alstroemeria hookeri* está compuesto por cuatro subespecies, el que posee una historia taxonómica cambiante debido al uso de diferentes interpretaciones de delimitación basados en distintos tipos de caracteres. En el contexto de poder contribuir a la discusión sobre este debate taxonómico, el presente estudio propone el uso de elipses de Fourier para evaluar si la forma geométrica de tépalos de las flores del complejo *A. hookeri* pueden presentar patrones evidentes de variación que permitan la discriminación y diferenciación de las entidades infraespecíficas. Para esto, se evaluaron conjuntos de tépalos usando imágenes digitalizadas, la descomposición de elipses de Fourier y análisis estadísticos multivariados confrontados con otras medidas escalares de forma (razón largo/ancho y perímetro/área). Los resultados indican una baja predictibilidad taxonómica del conjunto de tépalos evaluados, a pesar de las diferencias estadísticamente significativas, sugiriendo una limitada utilidad como carácter taxonómico. A pesar de esto, la exploración de métricas escalares reveló diferencias notorias en *A. hookeri* subsp. *sansebastiana*, la única especie ausente de zonas costeras del complejo. Adicionalmente, estas medidas también dieron sustento a otras hipótesis taxonómicas, tales como la separación a nivel de especies de *A. cummingiana*.

Abstract

The genus *Alstroemeria* is composed of about 90 species, with 57 taxa described for Chile, comprising 39 species, 10 subspecies and 8 varieties. Out of the 39 species described for Chile, 28% correspond to species complexes. Such groups represent a persistent challenge for the establishment of robust taxonomic proposals, given the great variability of their phenotypic attributes which preclude the establishment of objective delimitation criteria. For this reason, the exploration of quantitative approaches could help to resolve the current delimitation hypotheses, particularly with the use of geometric morphometry methods supported by explicit statistical tests of differentiation.

Currently, the *Alstroemeria hookeri* complex is composed of four subspecies, which present a continuously changing taxonomic history due to the use of different interpretations of delimitation based on different character types. As a contribution to this debate, this study aims to evaluate the use of Fourier ellipses to evaluate if the geometric shape of the tepals of the *A. hookeri* species complex flowers may present evident patterns of discontinuity, which allow discrimination and differentiation of its infraspecific entities. For this purpose, sets of tepals were evaluated using digitized images, Fourier ellipse decomposition, and multivariate statistical analysis confronted to other scalar measurements of shape variation (length/width and perimeter/area ratios). The results indicate a low taxonomic predictability of the set of tepals evaluated, despite of their high statistical significance, suggesting a limited utility as taxonomic character. Despite this, exploration of scalar metrics revealed notorious differences in *A. hookeri* subsp. *sansebastianana*, the only species absent from inland areas of the complex. Additionally, this evidence also supported other taxonomic hypotheses, such as the individual separation at the species level of *A. cummingiana*.

Introducción

Delimitación de identidades

La delimitación de entidades es el proceso que, mediante el uso de metodologías explícitas, define la identificación y límites de los grupos taxonómicos en estudio; especialmente a escalas inter e intraespecíficas (Carstens et al., 2013).

La delimitación de entidades taxonómicas (e.g., especies) es fundamental en los estudios de diversidad biológica (evolución, taxonomía, biogeografía, ecología) (Pinheiro et al., 2018). En Sistemática y específicamente en Taxonomía, la delimitación de entidades es una actividad fundamental que se ha ido refinando a través del tiempo respecto a los criterios y metodologías usadas (Wiens, 2007; Flot et al., 2015). Esta tarea es reconocida como compleja, dado que depende mucho de las características y mecanismos del proceso de diversificación que generó a las entidades bajo estudio, sobre todo si los procesos de divergencia (i.e., especiación) son recientes. En tales grupos destaca la presencia de diversos niveles de diferenciación a escala fenotípica y genotípica, los que suelen estar desacoplados y reflejan poca coherencia con el proceso de diversificación que los originó (Pinheiro et al., 2018).

Para enfrentar esta problemática, se han desarrollado distintos métodos, los que se enfocan en demostrar las diferencias respecto de las propiedades biológicas de las entidades, tanto con criterios explícitos como empíricos (Sites & Marchal, 2003). Por esto, los métodos para la delimitación son más efectivos cuando están basadas en estrategias estadísticas, dada su objetividad y reproducibilidad (Pinheiro et al., 2018). Adicionalmente, es también relevante definir un concepto de especie a utilizar, puesto que este determinará los criterios explícitos para el establecimiento de límites taxonómicos (de Queiroz, 2007).

Mientras que diversos autores han defendido el concepto biológico de especie como un criterio válido de delimitación (i.e., los límites basados en el aislamiento reproductivo para reconocer entidades delimitables; Mayr, 1942); en botánica se ha privilegiado conceptos más basados en la detección de discontinuidades fenotípicas y genéticas,

reconociendo que limitaciones al flujo génico pueden generar aislamiento y nuevas entidades pueden generarse a través de evolución tanto divergente como reticulada (i.e., hibridación y poliploidismo; Stuessy, 2009).

Complejos de especie taxonómicos

En el ámbito de la taxonomía, un complejo es un grupo de entidades similares las cuales no presentan caracteres que permitan su delimitación de manera precisa para considerarse una unidad taxonómica diferenciable (especie o entidades subespecíficas); no obstante, sustentan su existencia como entidades diferentes (Stuessy, 2009). Debido a la incapacidad de establecer límites taxonómicos claros, estos grupos representan un problema frecuente para el establecimiento de sistemas de clasificación taxonómica, propagando dificultades en aspectos de percepción y cuantificación de diversidad local y global (Adams et al., 2014). A pesar de esto, los complejos de especie representan un activo tema de estudio para la evaluación de mecanismos de adaptación y especiación local (Pinheiro et al., 2018).

En Chile, los complejos de especies se han estudiado principalmente en grupos de animales vertebrados e invertebrados (Varela & Haye, 2012; Victoriano et al., 2015). Por el contrario, en plantas la atención se ha generado más recientemente, dada la necesidad de actualizar y definir grupos complejos en recientes revisiones taxonómicas (Rodríguez et al., 2018).

Poder discernir entidades dentro de los complejos de especies en plantas, representa una dificultad particular usando caracteres morfológicos, dada la frecuente presencia de patrones de divergencia reticulados mayormente asociados a hibridación y poliploidía (Pinheiro et al., 2018). Por lo mismo, esto puede tener un particular impacto en el establecimiento de hipótesis de delimitación taxonómica, las que, al estar influenciada por criterios mayormente subjetivos, pueden resultar en múltiples e incongruentes propuestas de clasificación (Stace, 1991; Flot et al., 2010). Por lo mismo, para afrontar el desafío de generar propuestas taxonómicas correctas en

complejos de especies, es deseable usar aproximaciones objetivas, las que tienen mejor soporte con herramientas estadísticas y gráficas para la cuantificación y visualización de variación intra e interespecífica (Adams et al., 2013; Benítez & Püschel, 2014).

Morfometría geométrica y Elipses de Fourier

En términos simples, la morfometría geométrica (MG) es una herramienta que permite obtener información de la forma y llevarlo a un contexto matemático (Bookstein, 1991). A escalas comparativas, el estudio de la forma y su deformación se consigue eliminando los efectos de la escala y la rotación de un objeto, haciendo esta aproximación mucho más informativa que aproximaciones que utilizan medidas escalares o lineares (Rohlf & Slice, 1990; Rohlf et al., 1996; Adams & Funk, 1997; Benítez & Püschel, 2014). En plantas, este método ofrece ventajas para el aprovechamiento de la variación en estructuras vegetativas y reproductivas, en particular cuando se evidencian diferencias geométricas por sobre las de tamaño (Rohlf & Marcus, 1993; Van der Niet et al., 2010; Benítez & Püschel, 2014). El procedimiento usual se basa en tres pasos esenciales: 1) obtención de imágenes, 2) obtención de la información que describe la forma y 3) estudios exploratorios y confirmatorios de la covariación de la forma con factores causales mediante análisis multivariados (Charlin & Hernández, 2016). Siguiendo estos pasos se obtiene una forma accesible y rápida de recolección de datos y la generación de estudios comparativos confiables, de acuerdo a la deformación de formas, permitiendo el uso de imágenes como fotografías y/o ilustraciones digitalizadas (Webster & Sheets, 2010).

Dentro de las aproximaciones de MG más usadas en Botánica, destacan dos tipos: 1) las basadas en *landmarks* y 2) en contornos. Las basadas en *landmarks* proponen el uso de puntos dentro de un plano de coordenadas cartesianas que especifican su posición en el espacio (Bookstein, 1991). Estas referencias proporcionan una cobertura adecuada de la forma y son encontrados fácilmente en los organismos

(Zelditch et al., 2004). Comparativamente, con la cantidad de mediciones disponibles en los métodos morfológicos tradicionales, los *landmarks* proporcionan un nivel más detallado de cuantificación de la forma (por ejemplo: forma floral; Van der Niet et al., 2010). A pesar de ello, este método no es recomendable usar en objetos con contornos curvos y cerrados, dada la imposibilidad de determinar puntos referenciales homólogos directos para ubicar *landmarks*, dejando fuera de consideración a muchas estructuras redondeadas usualmente encontradas en estructuras biológicas (Hernández, 2013).

Alternativamente, el análisis de contornos se basa en la captura de formas mediante el ajuste de una fórmula matemática, usualmente derivada del cálculo de elipses de Fourier (Bookstein, 1991). Esta técnica permite una cuantificación completa de la forma del contorno basado en un ajuste de curvas aproximadas, a través de la suma de múltiples ondas de senos y cosenos, describiendo así el perímetro de la silueta de manera continua (Caple et al., 2017). El uso de la forma capturada a través del uso de las elipses de Fourier tiene ventajas cuando se estudian estructuras con deformaciones en bordes redondeados y continuas; elemento difícil y a veces casi imposible de hacer con *landmarks*, a menos que se use un número artificial de ellos. (Lestrel, 1997).

En botánica los estudios de morfometría geométrica, en su mayoría, usan análisis multivariados tradicionales (Van der Niet et al., 2010). Aunque inicialmente el análisis de Fourier se desarrolló en otros ámbitos de estudio, este nos otorga la posibilidad de reconstruir, transformar y reducir objetos de curvatura compleja una a una serie de componentes de seno y coseno más simples (Caple et al., 2017). Así la información presente en la línea continua de puntos es reducida a la composición de parámetros de esta función periódica, terminando en una disposición de espacio morfológico usando los coeficientes como ejes, los que son subsecuentemente comparados (Rohlf & Archie, 1984). En consecuencia, este método puede otorgar una representación gráfica de objetos con bordes continuos de una forma más natural y precisa que estructuras con puntos aislados o separados de manera individual (Neto et al., 2006). En plantas, este método se ha aplicado de forma exitosa para la discriminación de

formas en órganos redondeados tales como polen (Gottardini et al., 2007; Dell'Anna et al., 2009), frutos (Currie et al., 2000) y hojas (Franz et al., 1991).

Alstroemeria

El género *Alstroemeria* L, es uno de los 5 géneros de la familia Alstroemeriaceae, junto con *Bomarea* Mirb., *Leontochir* Phil., *Luzuriaga* Ruiz & Pav y *Drymophyla* R. Br. (Finot et al. 2018a). *Alstroemeria* es exclusivamente sudamericano y está compuesto por alrededor de 90 especies, con 57 taxones aceptados en Chile (39 especies, 10 subespecies y 8 variedades; Finot et al., 2018b). Este género es considerado uno de los más diversos de las angiospermas monocotiledóneas del país, con el 82% de taxones endémicos de la zona Mediterránea de Chile Central (Muñoz-Schick & Moreira-Muñoz 2003; Finot et al., 2018a; Rodríguez et al., 2018). Los taxones de *Alstroemeria* tienen un rango de distribución desde los 20°S (Región de Tarapacá) hasta los 53°S (Región de Magallanes), encontrando la mayor diversidad entre los 28°S (Región de Coquimbo) y 37°S (Región del Biobío) (Baeza et al., 2016a; Finot et al., 2018a).

La gran variabilidad de formas y colores que presentan las flores de este género ha hecho que sus especies sean bastante cotizadas en el mercado de la floricultura a nivel mundial (Shinoda & Murata, 2003). Sin embargo, tal nivel de variación también ha traído problemas para poder alcanzar una propuesta taxonómica robusta, la que recurrentemente continúa con cambios a escalas inter e intraespecíficas (Finot et al., 2018a). Como consecuencia, un importante número de taxones indeterminados han tenido que ser asignados a complejos de especies, los que corresponden al 28% del total del total de especies que crecen en Chile (Finot et al., 2018a). Dado que el principal criterio para la delimitación y clasificación taxonómica en *Alstroemeria* está basado en la interpretación de caracteres macro-morfológicos, recientes propuestas han apuntado al uso de nuevos caracteres y metodologías de discriminación. Un ejemplo, es el uso de caracteres cariotipos, los que han aportado evidencia para resolver varios problemas de delimitación en complejos de especies, tales como A.

hookeri (Baeza et al., 2010), *A. presliana* (Baeza et al., 2015), *A. ligtu* (Baeza et al., 2016a) y *A. magnifica* (Baeza et al., 2018a). Por otro lado, también se han realizado estudios multivariados morfométricos y colorimétricos, con los mismos propósitos en *A. presliana* (Finot et al., 2015; Finot et al., 2016).

Como resultado, el trabajo de exploración de nuevas aproximaciones y metodologías continúa en expansión, intentando de abordar la resolución de hipótesis de delimitación mediante criterios multifacéticos e integrativos (Finot et al., 2018a).

El complejo *Alstroemeria hookeri*

En Chile encontramos 11 complejos en el género *Alstroemeria* (Finot et al., 2018b), de los cuales *A. hookeri* Lodd. es uno de los más importantes por su número de taxones infraespecíficos (4) y su distribución geográfica disjunta. La configuración de los taxones infraespecíficos de este complejo ha pasado por distintos cambios, dependiendo de los caracteres e interpretación que han dado diversos autores. Inicialmente, en la primera revisión completa sobre el género, Bayer (1987) reconoció 4 subespecies dentro del complejo: *A. hookeri* subsp. *hookeri*, *A. hookeri* subsp. *recumbens* (Herbert) Bayer, *A. hookeri* subsp. *maculata* Bayer y *A. hookeri* subsp. *cunninghiana* (Herbert) Bayer. Posteriormente Muñoz-Schik & Moreira (2003) elevaron a *A. cunninghiana* al nivel de especie. Después, Baeza & Ruiz (2011) describieron y añadieron una nueva subespecie al complejo: *Alstroemeria hookeri* subsp. *sansebastianae* C.M. Baeza & E. Ruiz. Finalmente, Negritto y colaboradores (2015) describieron una nueva especie (*A. marticorenae*; Negritto et al., 2015) mediante estudios comparativos de caracteres morfológicos y citológicos, además de una interpretación ecológica sobre el tipo de suelo, basándose en individuos que probablemente habían sido morfológicamente confundidos con la subespecie *recumbens* del complejo *A. hookeri*.

Actualmente este complejo es endémico de Chile y está conformado por cuatro subespecies: *A. hookeri* subsp. *recumbens* y *A. hookeri* subsp. *maculata*, que se

distribuyen en la zona costera de la Región de Valparaíso entre los (30°10'S -33°31'S) y *A. hookeri* subsp. *hookeri* y *A. hookeri* subsp. *sansebastiana*, que se distribuyen entre la Región del Maule, Ñuble y del Biobío, entre los (35°31'S - 37°14'S) (Finot et al., 2018b).

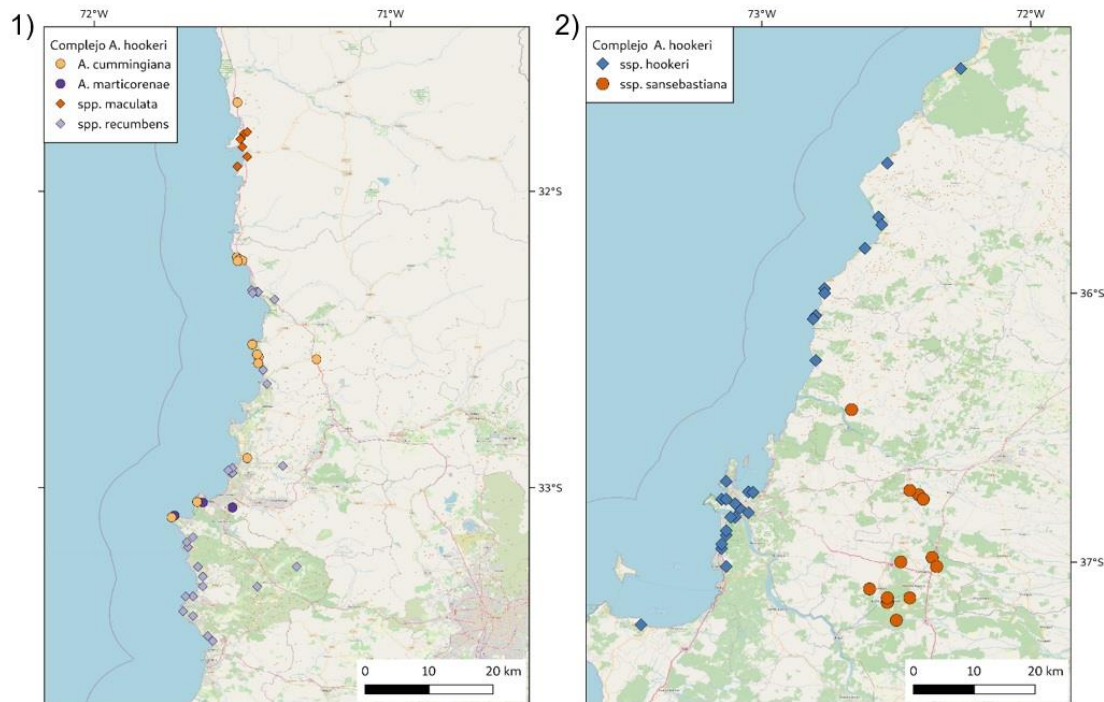


Figura 1.- 1) Distribución geográfica de las poblaciones del complejo *Alstroemeria hookeri* de la Región de Valparaíso y las especies *A. cummingiana* y *A. marticorenae*. 2) Distribución geográfica de las poblaciones del complejo *Alstroemeria hookeri* de la Región del Maule, Ñuble y del Biobío (Elaboración propia)

Todos los taxones reconocidos para este complejo, antes o después de su redefinición, incluidas las especies *A. cummingiana* y *A. marticorenae*, poseen caracteres distintivos en sus órganos vegetativos y florales, además de su distribución, los que se describen a continuación:

-*A. cummingiana*: Hojas angostas, glaucas, sésiles, resupinadas. Inflorescencia con 1-2 flores cada uno. Flores de color variable, desde rosado pálido a salmón; tépalos obovados con un mucrón corto; tépalos internos superiores más angostos y algo más

largos, con una mancha amarilla en los dos tercios inferiores y manchas lineares tenues en toda la superficie; tépalo inferior similar a los tépalos externos, sin manchas. Es perenne rizomatosa. Crece en suelos arenoso-arcillosos. Se distribuye desde Choapa, al norte de Los Vilos (31°42'S) en la Región de Coquimbo hasta Punta Curaumilla (33°06'S) en la Región de Valparaíso, desde el nivel del mar hasta los 260 m s.n.m. (Finot et al., 2018b).



Figura 2.- Referencia de ejemplar de *A. cumminghiana*.

-*A. marticorenae*: Hojas alternas, sésiles, glabras, linear-lanceoladas, algo ensanchadas en la base, con margen entero. Inflorescencias con 1-7 flores. Flores de color rosado pálido a intenso; tépalos externos, a veces con un mucrón corto de color blanco, amarillo o verde; tépalos internos superiores más largos y conspicuos, romboidales, generalmente más angostos, rosado más intenso hacia el ápice, variando hasta blanquecino en la base, con una mancha amarilla en la zona media; tépalo interno inferior romboidal, sin rayas. Estambres amarillos, con anteras rosadas. Es perenne con rizoma cilíndrico. Crece en suelos duros y compactos, entre los 70-290 m s.n.m. Su distribución es restringida a la costa de la Región de Valparaíso (Finot et al., 2018b). Se diferencia del complejo *A. hookeri*, por crecer en tierra arcillosa y por diferencias en el cromosoma 3, por ser submetacéntrico (Negritto et al. 2015; Finot et al. 2018b).



Figura 3.- Referencia de ejemplar de *A. marticorenae*.

-*A. hookeri* subsp. *hookeri*: Se caracteriza por poseer hojas lineares, glabras, glaucas. Flores blanquecinas a rosadas; tépalos exteriores oblanceolados, agudos, brevemente mucronados, tépalos internos superiores más angostos que los externos, con una franja amarilla al medio, de color rosado más pálido hacia la base y con manchas atropurpúreas lineares, cortas, que se extienden desde la franja amarilla hasta la base; tépalo inferior similar a los externos, pero sin manchas. Es perenne, pequeña con rizoma corto del cual nacen raíces almacenadoras blanquecinas. Se distribuye en la zona costera de las regiones de Maule, Ñuble y Biobío, crece en suelos arenosos, desde el nivel del mar hasta los 105 m s.n.m. (Finot et al., 2018b).



Figura 4.- Referencia de ejemplar de *A. hookeri* subsp. *hookeri*.

-*A. hookeri* subsp. *sansebastianana*: Esta subespecie tiene hojas angostamente lanceoladas, sésiles, con el margen liso. Flores rosadas; tépalos externos rosa pálido, con mucrón de color verde; tépalos internos superiores más angostos, oblanceolados, trinerves, de color rosa pálido, con una franja amarilla, patrón de manchas de cortas líneas color marrón; tépalo interno inferior romboidal a oblanceolado, de color rosa pálido, sin la franja amarilla; en todos los tépalos internos hay papilas en el borde exterior e interior. Se distingue por ser plantas más altas y por las manchas de los tépalos internos superiores que son de color café y no atropurpúreas. Es perenne, con rizomas cilíndricos, simples; tallos erectos, raro decumbentes. Se caracteriza por su distribución más interior, presentándose en las dunas continentales del Pangal del Laja, separada de la subsp. *hookeri* por la cordillera de la Costa. Crece en suelo arenoso y seco, su distribución está en las regiones de Ñuble (Quillón) y Biobío, (Cabrero, Bulnes, Laja, Yumbel (Baeza et al., 2010; Finot et al., 2018b). Su principal diferencia con la subespecie típica es la altura de las plantas y las máculas café, en lugar de atropurpúreas (Finot et al. 2018b).



Figura 5.- Referencia de ejemplar de *A. hookeri* subsp. *sansebastiana*.

-*A. hookeri* subsp. *recumbens*: Esta subespecie se distingue por sus tépalos largamente mucronados y por su hábito decumbente. Es perenne, y suele ser de baja estatura. Flores casi blancas hasta de color rosado intenso; tépalos externos obovado-romboidales, adelgazados en el ápice, terminando en un mucrón oscuro; tépalos internos superiores más angostos, lanceolados, amarillos en el centro con manchas marrones; mientras que tépalo interno inferior no tiene manchas. Crece en suelo arenoso y dunas litorales y su distribución está restringida a las regiones de Coquimbo y Valparaíso, se encuentra desde el nivel del mar hasta los 280 m s.n.m. Su principal diferencia con la subespecie típica es su hábito decumbente y los tépalos largamente mucronados (Finot et al. 2018b).



Figura 6.- Referencia de ejemplar de *A. hookeri* subsp. *recumbens*.

-*A. hookeri* subsp. *maculata*: Esta subespecie es típica por las hojas de los tallos estériles más largas, por tener el tépalo interno inferior siempre con manchas atropurpúreas y por tener los tépalos largamente mucronados. Es perenne con flores rosado-pálidas o de un color más intenso. Crece en suelo arenoso y su distribución está restringida a la Región de Coquimbo, se encuentra entre el nivel del mar y los 140 m. s.n.m. La principal diferencia con el resto de las subespecies del complejo es la presencia de manchas en el tépalo inferior interno (Finot et al., 2018b).



Figura 7.- Referencia de ejemplar de *A. hookeri* subsp. *maculata*.

Dada la cantidad de taxones que posee este complejo, la particular distribución geográfica de sus subespecies (marcada distribución disjunta Norte – Sur) y su nivel de endemismo, este grupo ha sido foco de diversos estudios, con la finalidad de determinar la integridad de sus taxones infraespecíficos (Ruiz et al., 2010, Baeza et al., 2015, 2016a, 2016b, 2018a). Por lo mismo, su estudio detallado podría contribuir, no solo a dilucidar la delimitación taxonómica de sus taxones, sino también a comprender los procesos de divergencia entre linajes en otros complejos del género. Así mismo, un estudio de esta naturaleza podría contribuir a apreciar la variabilidad de formas y colores, dado la importancia que ha adquirido recientemente desde el punto de la floricultura (Finot 2018b).

Contexto

Considerando la gran variabilidad existente en los caracteres florales y vegetativos, el género *Alstroemeria* destaca por ser un grupo difícil para establecer hipótesis taxonómicas estables de delimitación (Muñoz-Schick & Moreira-Muñoz, 2003; Finot et al., 2018a). Sumado a esto, dada la influencia de criterios subjetivos de delimitación, se sugiere que la aplicación de aproximaciones explícitas y objetivas podrían efectivamente ayudar a resolver la delimitación a escalas inter e intraespecíficas (Finot et al., 2018a). Dada la variación existente en los tépalos en las subespecies de *A. hookeri*, dominado por tépalos curvos y, con frecuencia, fuertemente mucronados, el uso de morfometría geométrica basada en contornos podría contribuir a revelar patrones de diferenciación que aporten evidencia soportando, o no, la actual propuesta de clasificación de este complejo. En este sentido, el uso de una aproximación de contornos basados en elipses de Fourier podría ayudar efectivamente a prospectar la delimitación de entidades infraespecíficas en el complejo *Alstroemeria hookeri*. Además, se incluirán las especies *A. cummingiana* y *A. marticorenae*, dado la relación taxonómica que han tenido con el complejo, para determinar la capacidad de discriminación de este carácter a escalas interespecíficas. Por otro lado, se compararán los resultados con mediciones escalares que pudieran tener importancia

en la diferenciación de los taxones estudiados, como, por ejemplo, razón largo/ancho y área/perímetro de los tépalos.

Hipótesis

La variación morfo-geométrica de los tépalos presente en los representantes del complejo *Alstroemeria hookeri*, realizada por el método de elipses de Fourier, es capaz de discriminar sus entidades intraespecíficas actual y previamente reconocidas.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar cuantitativamente los cambios morfológicos de los tépalos, mediante el método de elipse de Fourier, con la finalidad de caracterizar y discriminar las entidades intraespecíficas del complejo *Alstroemeria hookeri*.

Objetivos específicos

- Caracterizar y cuantificar la diferenciación de forma entre tépalos del complejo de *A. hookeri*, obtenidas mediante el uso de descomposición de elipses de Fourier.
- Determinar el poder de discriminación, mediante la deformación de formas de los tépalos, con técnicas estadísticas multivariadas (Análisis Discriminante y Validación Cruzada).
- Contrastar los resultados de morfometría geométrica con morfometría de medidas escalares, usando valores de predictibilidad.

Metodología

Preparación del material

Para el presente análisis se usó un total de 130 flores (679 tépalos), pertenecientes a los 4 taxones del complejo *A. hookeri*, además de las especies *A. cumminghiana*, *A. marticoarenae* y muestras clasificadas como indeterminadas, siguiendo la información adjunta en sus etiquetas. Esta colección fue armada a partir de material disponible en el herbario CONC (58 muestras) y de material aún en procesamiento de la colecta de José Murillo y colaboradores (72 muestras). Para el montado, las flores fueron rehidratadas en agua tibia con jabón para, posteriormente, separar, estirar y prensar cada tépalo en una mica plástica. Una vez secos, los tépalos fueron montados en trozos de papel-cartón, siguiendo su disposición floral, de acuerdo a Finot et al. (2018b) para su posterior digitalización.

Digitalización

Las muestras montadas de flores reconstituidas se escanearon con el Scanner Epson 11000 XL, usando una resolución de 400 dpi y guardadas en formato jpg. Posteriormente, usando el programa GIMP version.2.10.12 (The GIMP Development Team, 2019), se corrigieron las imágenes redefiniendo bordes alterados por el proceso de estirado y montaje, intentando reconstituir la curvatura natural de los tépalos. Las imágenes fueron binarizadas con el programa ImageJ versión 1.53t (Rasband, 2018), dejando un fondo blanco y la silueta de los tépalos en negro; equivalentes a valores de ráster de 0 y 1 (Elizondo & Maestre, 2005). Cada imagen fue recortada para obtener imágenes separadas de cada tépalo, las que se organizaron en: Tépalo Inferior Externo (**TIE**), Tépalo Inferior Interno (**TII**), Tépalo Superior Externo (**TSE**) y Tépalo Superior Interno (**TSI**). Además, para una corrección de los datos para el estudio de forma se generaron nuevos sets de datos: Tépalo Inferior Externo Cortado (**CTIE**), Tépalo Inferior Interno Cortado (**CTII**), Tépalo Superior Externo Cortado (**CTSE**) y Tépalo Superior Interno Cortado (**CTSI**). Para medidas escalares se usaron los

siguientes sets de datos: Tépalos Inferiores Externos Alineados (**ATIE**), Tépalos Inferiores Internos Alineados (**ATII**), Tépalos Superiores Externos Alineados (**ATSE**) y Tépalos Superiores Internos Alineados (**ATSI**).

Estandarización

La información con la identificación preliminar para cada tépalo fue enlistada en archivo separado por comas (i.e., CSV), con el programa Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2018), el cual fue importado a la plataforma estadística R v.3.6.1 (R core team, 2019), según información recopilada de sus etiquetas de identificación. Luego, las imágenes fueron estandarizadas por resolución, usando una interpolación de 5000 puntos por tépalo. Posteriormente, para eliminar deformidades y discontinuidades generadas durante la digitalización y binarización de imágenes, se realizó una corrección por suavizado de bordes. Finalmente, las imágenes fueron normalizadas por rotación y centrado, mediante un proceso de Procrustes (Hurley & Cattell, 1962), el que fue dirigido por los tres *landmarks* previamente fijados en el ápice y en los bordes inferiores (ver figura 8), en la base de la lámina, de cada figura. Debido a la curvatura natural de los tépalos, la cual puede inducir alteraciones de especularidad y asimetría en la percepción de deformidad geométrica (Iwata et al. 1998), se procedió a recortar su porción inferior, respetando una distancia de $2/3$ desde el ápice hasta el ensanchado de la lámina, previo a la corrección por Procrustes.

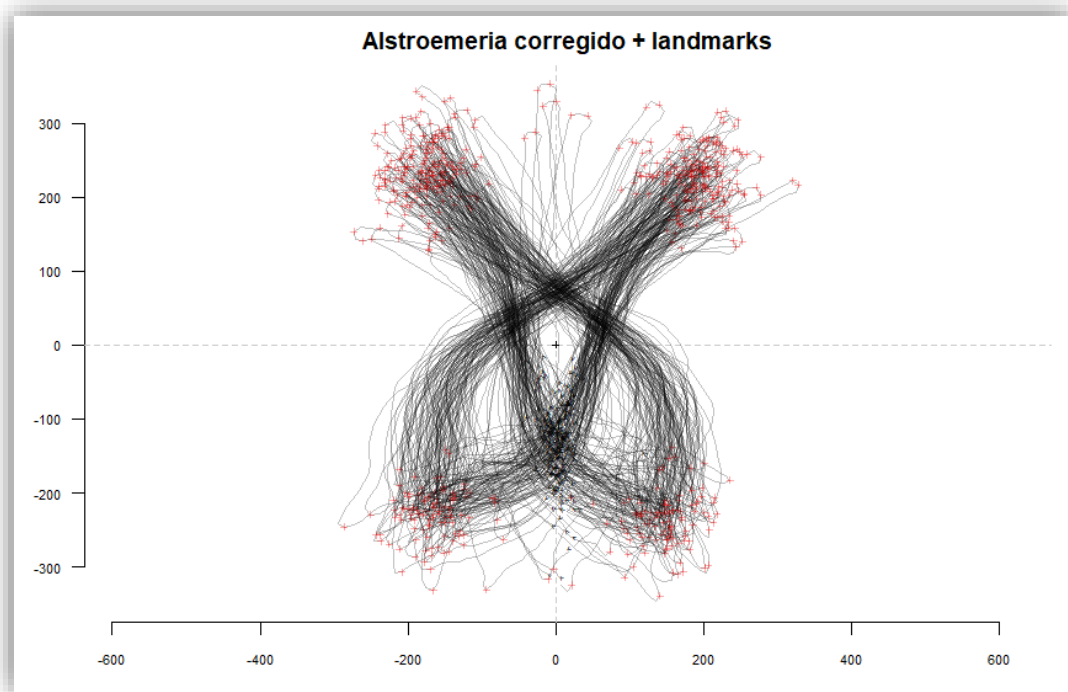


Figura 8.- Posición de los *landmarks* en los tépalos evaluados (dos en la base y uno en el ápice del tépalo).

Registro de formas vía descomposición elíptica de Fourier.

Una vez que fueron estandarizadas, las imágenes se sometieron al análisis de descomposición elíptica de Fourier. Este se dirigió buscando funciones armónicas que representaran un 99% del contorno de los tépalos. Los coeficientes de estas funciones resultantes fueron analizados con un Análisis de Componentes Principales (PCA), de forma de retratar el morfoespacio general de cada set de tépalos analizados (Zelditch et al., 2004). Para esto, se usó el número de componentes representativos del 99% de la varianza explicada.

Además, con la finalidad de comprobar el poder de discriminación basado en registro de contornos con descomposición de Fourier, se realizaron medidas escalares (largo, ancho, área y perímetro) en todas las imágenes analizadas. Para esto, las medidas se

agruparon en razón largo/ancho y área/perímetro como predictores simples de formas, previo a la corrección de Procrustes (Schrader et al., 2021).

Análisis Estadísticos

Los componentes recuperados desde el PCA fueron sometidos a dos tipos de análisis estadísticos para medir diferenciación por forma. Primero, se optó por un método de clasificación supervisado, el cual basa las comparaciones sobre set de datos con un rótulo previamente establecido (McLachlan, 2004; Ezard et al., 2010); en este caso, se usaron las categorías de especie y subespecie previamente asignados en las etiquetas de cada ejemplar analizado. Para esto se usó un análisis multivariado de varianza (MANOVA) con la finalidad de determinar diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los componentes principales de los grupos previamente clasificados. A continuación, se realizó un análisis linear discriminante (LDA) y validación cruzada (VC), el cual evalúa la exactitud de la asignación *a priori* (i.e., el asignado en las etiquetas) de cada grupo de tépalos. Se asumió un umbral sobre un 70% de tépalos correctamente asignados para considerar una predictibilidad aceptable por set de datos (Vacárel & Vargas, 2010).

Segundo, se empleó un método de clasificación no supervisado, el cual determina la clasificación de grupos sin un conocimiento *a priori* de las observaciones en análisis; vale decir, independiente de la propuesta taxonómica previa (Raftery & Dean, 2006). Estos fueron realizados usando una clasificación no supervisada vía aglomeración de modelos con mixturas Gaussianas, donde las variables se pueden apreciar utilizando la máxima probabilidad para aglomerar observaciones basado en la reconstrucción de elipses (i.e., distribución normal) a partir de datos fenotípicos, sin guiarse por clasificaciones preexistentes, en este caso especie y subespecie (McLachlan & Krishnan, 2008; Cadena et al., 2018). Las propuestas de clasificación supervisada y no supervisadas fue comparada en términos de la proporción individuos correctamente predichos, propuesta por LDA + VC (supervisada) o por mixturas Gaussianas (no supervisada). Previamente al análisis, se redujo el número de componentes principales

a aquellos que fueran más informativos para la discriminación basado en elipses Gaussianos, lo que se generó usando la función *clustvarsel*. Posteriormente, los componentes seleccionados se usaron para inferir los grupos más probables usando un criterio de información Bayesiano (BIC), lo que fue inferido con la función *mclust*.

Para el caso de la comparación con medidas escalares, las observaciones se realizaron usando tépalos completos y alineados, sin corrección de Procrustes, con un test de comparación de medianas (no paramétrico), dada la ausencia de distribución normal en los datos analizados. Se condujo un test de Kruskal-Wallis, con una comparación pareada *posthoc* basada en un test de Dunn (Dinno, 2015; Dinno & Dinno, 2017). Todos los análisis mencionados fueron realizados con el paquete estadístico de *Momocs* v. 1.4.0 (Bonhomme et al., 2014), *dunn.test* v. 1.3.5 (Dinno & Dinno, 2017), *vegan* v. 2.6-4 (Oksanen et al. 2013), *clustvarsel* v. 4.2.2, *mclust* v. 6.0.0 (Scrucca et al., 2016) y *car* v. 4.2.2., todos disponibles para la plataforma estadística R v.4.2.2 (R Core Team, 2022).

Resultados

Análisis de descomposición de elípticos de Fourier

Para el análisis de Fourier se requirieron 22 armónicos para representar la forma de los Tépalos Inferior Interno Cortado (**CTII**) y Tépalos Superiores Internos Cortados (**CTSI**); y 24 armónicos para Tépalos Inferiores Externos Cortados (**CTIE**) y Tépalos Superior Externo Cortado (**CTSE**) (ver Tabla 1).

Tabla 1. Números de armónicos para cada grupo de tépalos, según su representatividad, obtenidos por descomposición de Elipses de Fourier.

Grupo	Representación	90%	95%	99%	99.9%
CTIE		5	6	11	24
CTII		5	6	10	22
CTSE		5	6	11	24
CTSI		5	6	10	22

Análisis de componentes principales

Este análisis muestra que, en el PCA, el primer componente es el que da la mayor explicación de varianza (**CTIE**: 0.753, **CTII**: 0.822, **CTSE**: 0.591 y **CTSI**: 0.503) (Fig. 9). Para el set de datos **CTIE** se retuvieron 11 componentes, para **CTII**, 8 componentes, para **CTSE** 14 componentes y para **CTSI** 16 componentes.

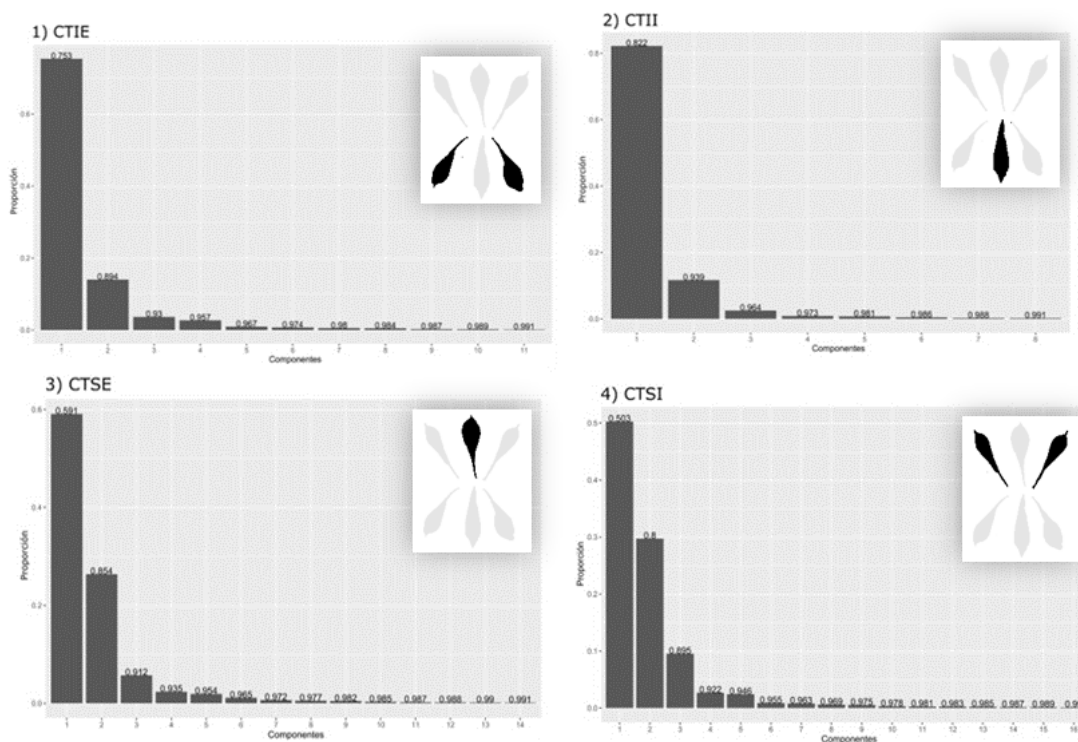


Figura 9. Proporción de los distintos componentes retenidos para cada grupo de tépalos.

Como cada grupo de tépalos difiere en la cantidad de componentes, la variabilidad puede visualizarse de manera distinta, sí se comparan las distintas combinaciones de los componentes. En los cuatro morfo espacios reconstruidos, cada uno proveniente de cada set de datos analizados, no fue posible reconocer diferencias de los grupos definidos *a priori*. Destaca que en el set **CTII** se denota la presencia de una ordenación asimétrica (probablemente especular), debido a la disposición en “forma de herradura” de puntos. A continuación, en la figura 10, podemos ver el PCA de los distintos grupos con el componente 1 y 2 que fueron los más variables.

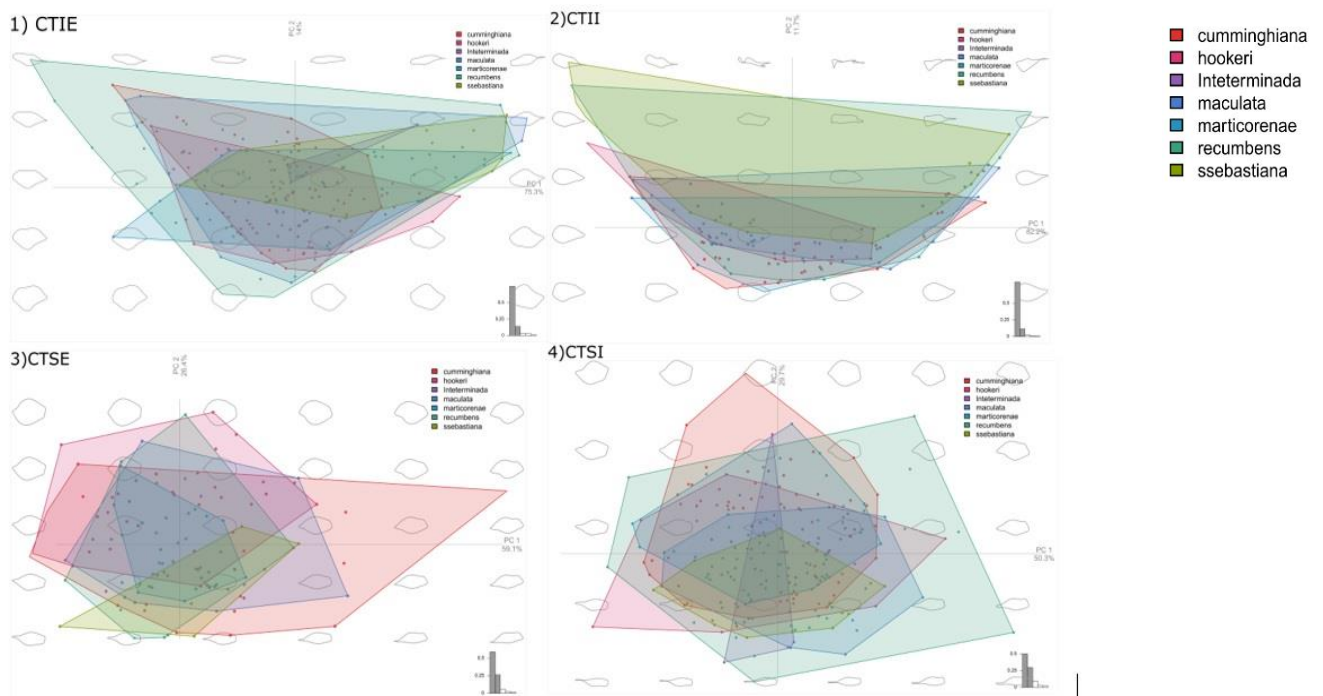


Figura 10. Análisis de componentes principales para cada grupo de tépalo en el morfoespacio, basado en el ordenamiento de los dos primeros componentes.

Análisis estadístico multivariado

Los resultados del MANOVA siguieron la presencia de diferencias estadísticamente significativas para los distintos sets de tépalos ($p < 0.01$). De estos cuatro, sólo **CTSE** fue ligeramente menos significativo (ver Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del Análisis estadísticos multivariados para cada set de datos donde el valor p muestra la significancia.

Grupo	Df	H-L	F	p
CTIE	6	1.393	4.164	0.001
CTII	6	0.920	1.981	0.001
CTSE	6	2.387	2.709	0.005
CTSI	6	1.678	3.554	0.001

En el caso de las comparaciones pareadas (pairwise) presentes en las tablas 3a,b,c,d, se pueden distinguir diferentes niveles de significancia, en las cuales no todas las comparaciones resultaron estadísticamente significativas. Por una parte, destacan los sets de datos **CTIE** y **CTSI**, los que presentaron mayor número de diferencias significativas entre las especies y subespecies evaluadas.

Tabla 3a. Tabla resumen de valor-p para **CTIE**.

CTIE	cumminghiana	hookeri	Indeterminada	maculata	marticorenae	recumbens	sansebastian a
cumminghiana		0.01839*	0.0004***	0.0000***	0.0511	0.0000***	0.0000***
hookeri			0.0001***	0.0004***	0.0083**	0.0000***	0.0000***
Indeterminada				0.2272	0.1021	0.2875	0.3627
maculata					0.3029	0.9127	0.0845
marticorenae						0.0316*	0.0024**
recumbens							0.04233*

NOTA: '***' <0.001; '**' <0.01; '*'; <0.05; ' ' <0.1. La utilización de colores tiene como objetivo facilitar la comprensión del texto por parte del lector.

Tabla 3b. Tabla resumen de valor-p para **CTII**.

CTII	cumminghiana	hookeri	Indeterminada	maculata	marticorenae	recumbens	sansebastian a
cumminghiana		0.03123*	0.01765*	0.01177*	0.5275	0.0511	0.0000***
hookeri			0.0026**	0.01856*	0.4522	0.2390	0.0001***
Indeterminada				0.5108	0.1476	0.5064	0.9314
maculata					0.2942	0.6856	0.1155
marticorenae						0.6484	0.01227*
recumbens							0.0331

NOTA: '***' <0.001; '**' <0.01; '*'; <0.05; ' ' <0.1. La utilización de colores tiene como objetivo facilitar la comprensión del texto por parte del lector.

Tabla 3c. Tabla resumen de valor-p para **CTSE**.

CTSE	cumminghiana	hookeri	Indeterminada	maculata	marticorenae	recumbens	sansebastianana
cumminghiana		0.0055**	0.1240	0.6632	0.6207	0.1930	0.04558*
hookeri			0.01298*	0.0138	0.0229	0.0009***	0.0000***
Indeterminada				0.2141	0.0647	0.2091	0.4486
maculata					0.9844	0.8613	0.1190
marticorenae						0.8954	0.0644
recumbens							0.0579

NOTA: '***' <0.001; '**' <0.01; '*';<0.05; ' ' <0.1. La utilización de colores tiene como objetivo facilitar la comprensión del texto por parte del lector.

Tabla 3d. Tabla resumen de valor-p para **CTSI**.

CTSI	cumminghiana	hookeri	Indeterminada	maculata	marticorenae	recumbens	sansebastianana
cumminghiana		0.02115*	0.0949	0.0000***	0.1933	0.0000***	0.0000***
hookeri			0.3659	0.0000***	0.1579	0.0001***	0.0000***
Indeterminada				0.4804	0.4448	0.4755	0.1640
maculata					0.0001***	0.3548	0.7063
marticorenae						0.0583	0.0000***
recumbens							0.04899*

NOTA: '***' <0.001; '**' <0.01; '*';<0.05; ' ' <0.1. La utilización de colores tiene como objetivo facilitar la comprensión del texto por parte del lector.

Las comparaciones con el set **CTIE**, indican alta significancia de discriminación entre *A. cummingiana* y todas las subespecies del *A. hookeri* (tablas 3a, 3b, 3c y 3d). Además de la muestra indeterminada y entre la subespecie *hookeri* y el resto de las subespecies del complejo.

Por otro lado, a través de **CTSI**, se puede discriminar entre los siguientes pares de taxones estudiados: *A. cummingiana* y todas las subespecies de *A. hookeri*; entre la subespecie *hookeri* y el resto de las subespecies del complejo; entre las subespecies *maculata* y *A. marticorenae* y entre *A. marticorenae* y la subespecie *sansebastiana*.

Con menor números de recuadros significativos, **CTII** sirve para discriminar entre la subespecie *sansebastiana* y la subespecie *hookeri* y *A. cummingiana*. **CTSE**, sirve para discriminar entre la subespecie *hookeri* y las subespecies *recumbens* y *sansebastiana*.

Análisis discriminante linear (LDA)

Con el LDA no se observa mayor diferencia en el morfoesacio para los sets de **CTIE** y **CTII**. Para el caso de **CTSE** *A. cummingiana* y *A. hookeri* subsp. *hookeri* podrían distar levemente dentro del morfoespacio respecto al resto de especies y subespecies. En el caso de **CTSI** las indeterminadas tienden a diferenciarse del resto (Figura 11).

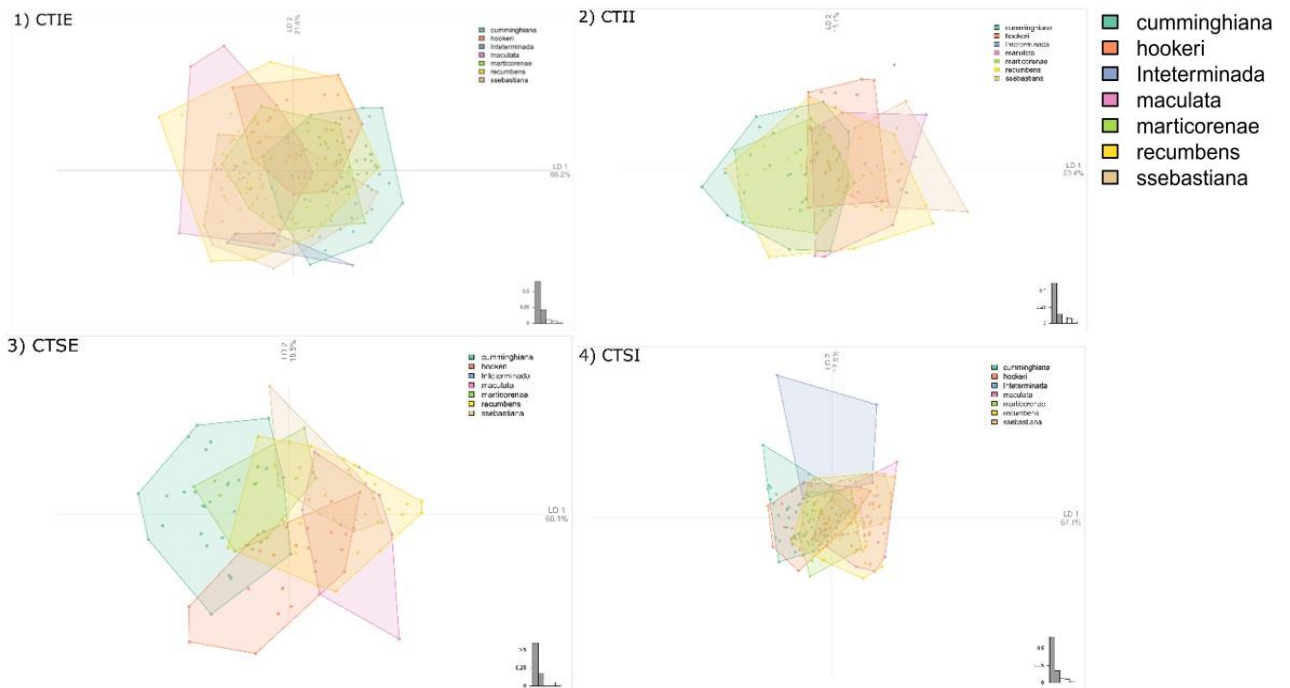


Figura 11. Esquema del Análisis lineal discriminante ocupando los componentes principales.

Análisis de validación cruzada

Para este análisis, ninguna de las combinatorias demostró suficiente nivel de predictibilidad (i.e., correcta predicción sobre 70%); excepto para la especie *A. cumminghiana* en **CTIE** con un 75% (Tabla 4). Adicionalmente, un 71% de muestras de *A. hookeri* subsp. *maculata* fue clasificada como *A. hookeri* subsp. *recumbens*, en **CTSE**. El porcentaje de predictibilidad para el resto del set de tépalos no superó el 40% de predictibilidad (Tabla 4). En las Figuras 12a,b,c y d podemos encontrar la predicción completa de las especies y subespecies.

Tabla 4. Resumen del Análisis de validación cruzada expresados en porcentajes de predictibilidad en cada grupo de tépalo.

Grupo	% correcto grupal	% correcto individual						
		cunninghiana	hookeri	indeterminada	maculata	marticorenae	recumbens	sanebastian
CTIE	38.9	0.754	0.294	0.00	0.13	0.00	0.462	0.167
CTII	32.8	0.586	0.350	0.00	0.00	0.00	0.379	0.286
CTSE	37.6	0.613	0.316	0.00	0.00	0.182	0.464	0.333
CTSI	36.6	0.691	0.333	0.00	0.038	0.00	0.441	0.250

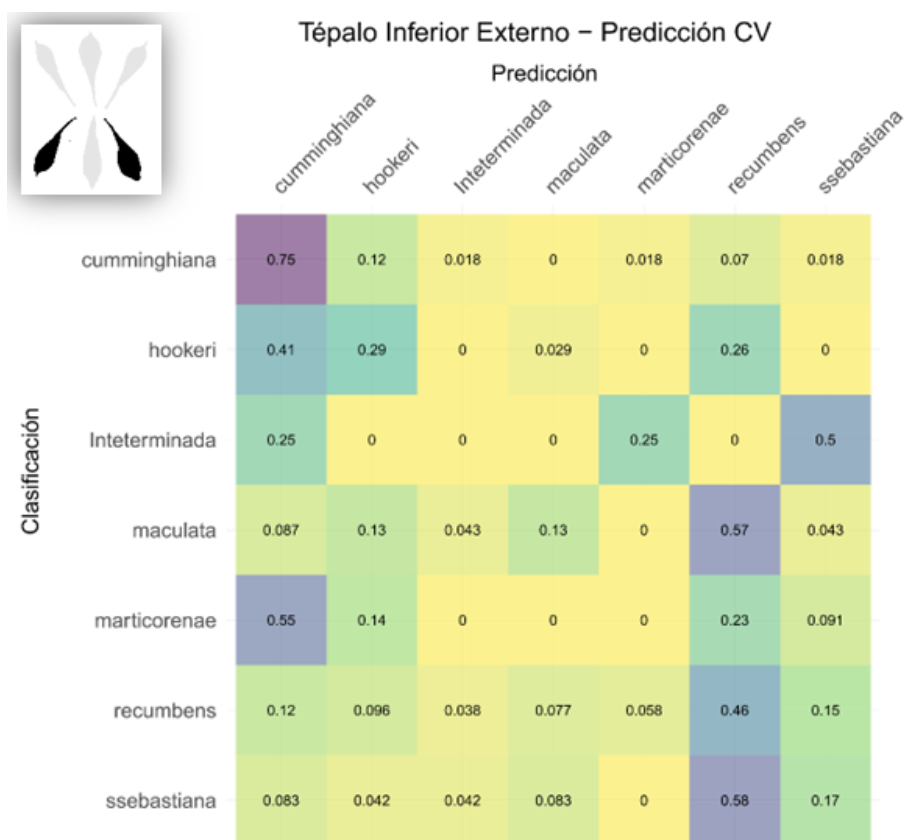


Figura 12a. Gráfico de predictibilidad del Análisis de validación cruzada para **CTIE**.

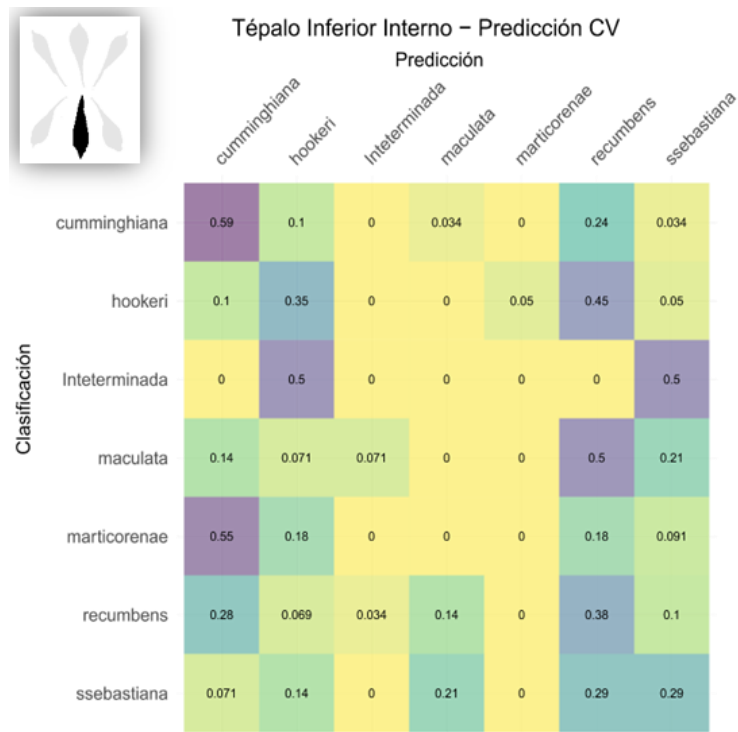


Figura 12b. Gráfico de predictibilidad del Análisis de validación cruzada para **CTII**.

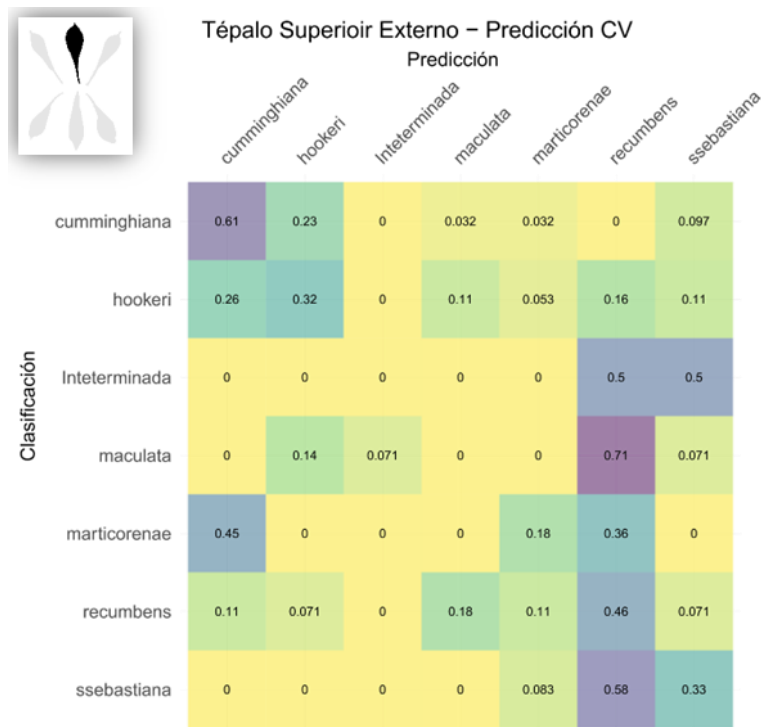


Figura 12c. Gráfico de predictibilidad del Análisis de validación cruzada para **CTSE**.

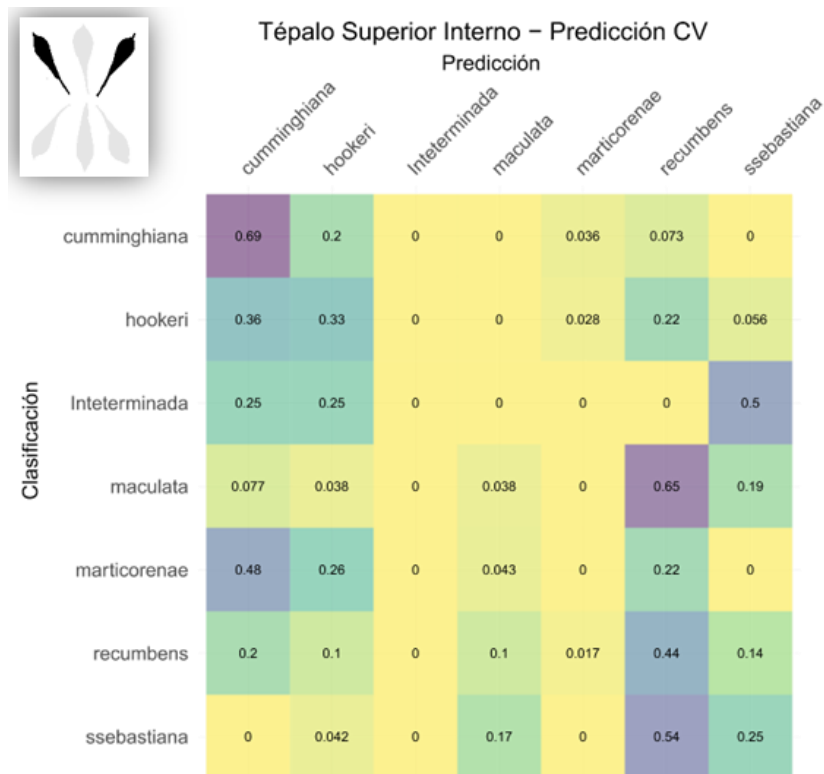


Figura 12d. Gráfico de predictibilidad del Análisis de validación cruzada para **CTSI**.

Medidas escalares

Para las mediciones escalares, en relación con la razón largo/ancho (LW) y área/perímetro (AP). Para estas mediciones se usaron los sets de datos con los tépalos alineados. Se observaron diferencias significativas principalmente en el set de Tépalos Superior Interno Alineado (**ATSI**). En general, las especies que más diferencias presentaron para la totalidad de set de tépalos fueron *A. cumminghiana*, *A. hookeri* subsp. *hookeri* y *A. hookeri* subsp. *sansebastiana* (Figura 13 y 14).

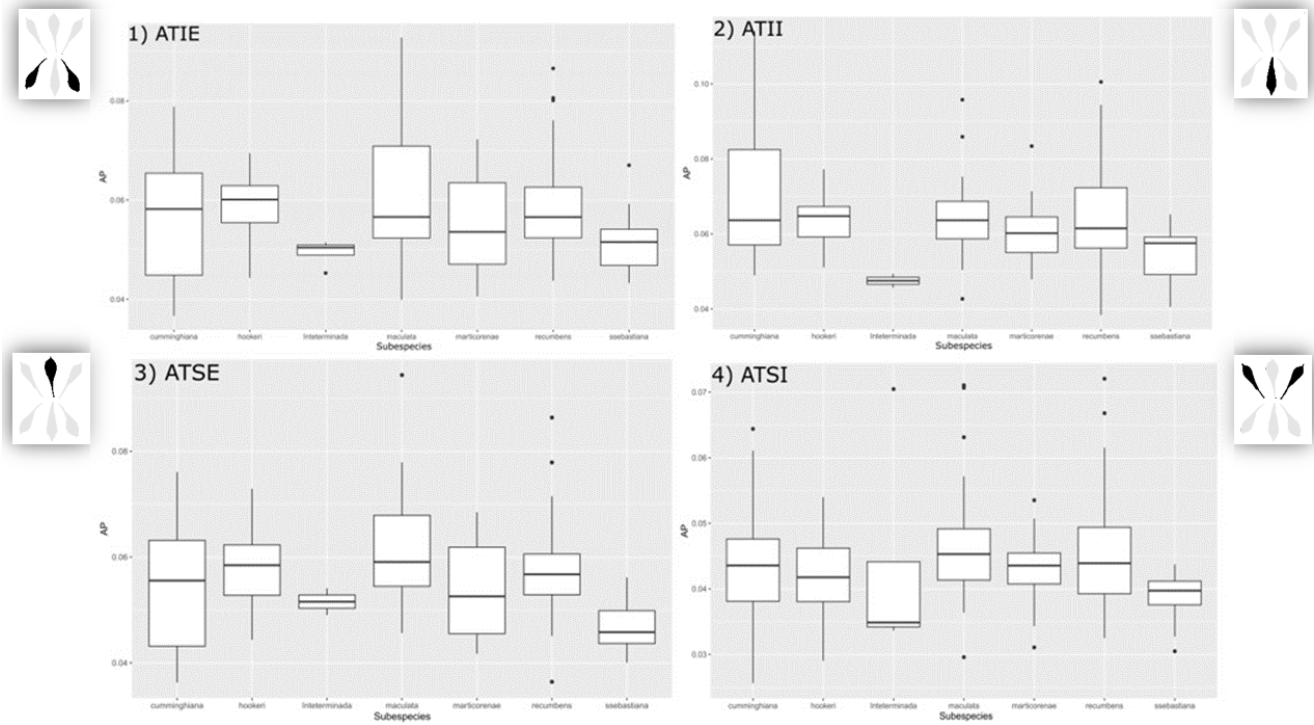


Figura 13. Diagrama de medidas de área/perímetro (AP) para los cuatro tépalos.

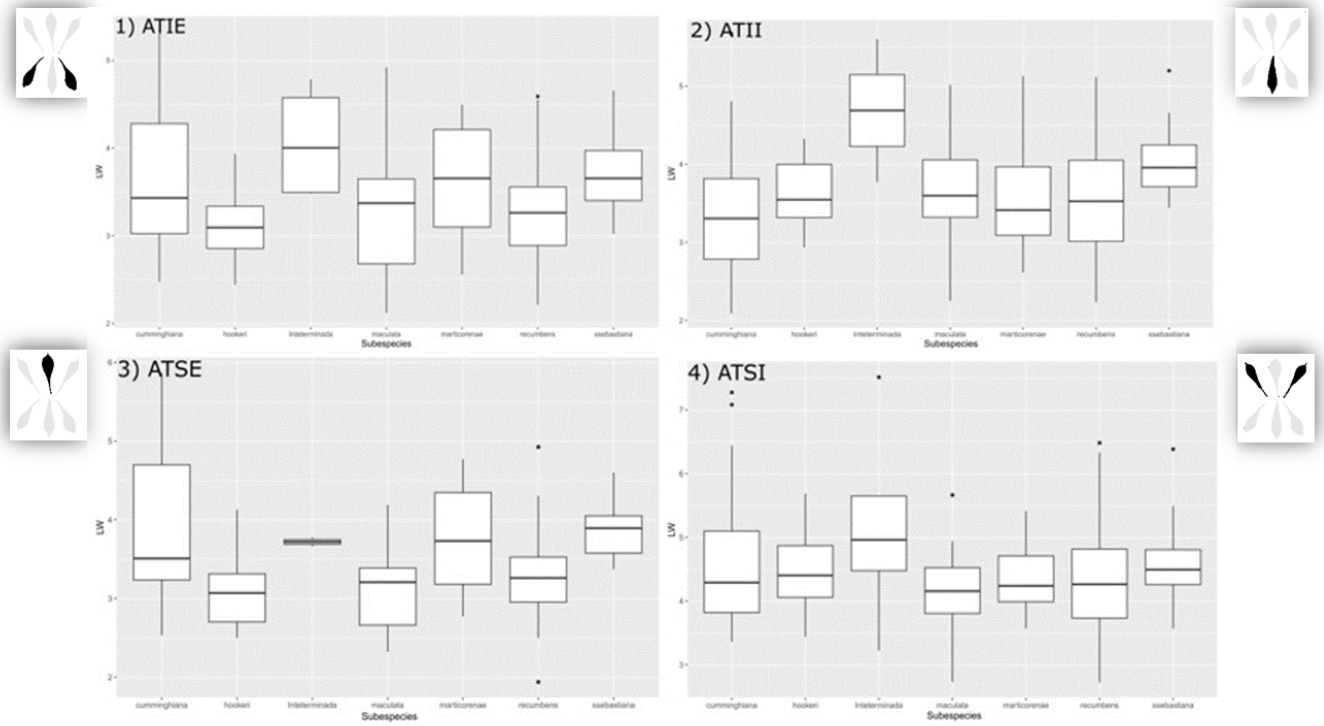


Figura 14. Diagrama de medidas de largo/ancho (LW) para los cuatro tépalos.

Prueba no-paramétrica

Dentro de las comparaciones estadísticas, la relación área/perímetro (AP) demostró diferencias significativas para todos los sets de datos. Sólo el set **ATSI**, para la relación largo/ancho (LW), no exhibió diferencias estadísticamente significativas (ver Tabla 5).

Tabla 5. Resumen de resultados de la prueba estadística Kruskal-Wallis.

Grupo	AP			LW		
	Chi-cuadrado	df	valor-p	Chi-cuadrado	df	valor-p
ATIE	19.6288	6	0	28.494	6	0
ATII	16.7557	6	0.01	6.788	6	0.05
ATSE	18.9132	6	0	26.3267	6	0
ATSI	19.6006	6	0	7.8364	6	0.25

Dunn-test más corrección de Bonferroni

Posteriormente, dentro del contexto de comparaciones por pares de taxones (i.e., pairwise; tablas 6 y 7), se observó que la razón AP presentó diferencias significativas únicamente en *A. hookeri* subsp. *sansebastiana* respecto a los demás taxones presentes en cada set de tépalos. Para la razón LW, a pesar de que se evidenciaron mayores niveles de diferencias entre pares de taxones, estos no fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$). La única excepción fue *A. hookeri* subsp. *sansebastiana*, la que mostró diferencias significativas para todos los sets de tépalos, a excepción ATSI, la que no presentó diferencias para ninguna combinación (tablas 6 y 7).

Para la relación área/perímetro (AP) observamos las siguientes combinaciones:

Tabla 6a. Diferencias por pares de taxones en las combinaciones de área/perímetro para **ATIE**, basadas en el test post-hoc de Dunn.

ATIE	cumminghiana	hookeri	Indeterminada	maculata	marticorenae	recumbens	sansebastian
cumminghiana		1	0.6222	1	1	1	0.0435
hookeri			0.2098	1	0.7705	1	0.0037*
Indeterminada				0.3106	1.0000	0.4835	1
maculata					1	1	0.0213*
marticorenae						1	1
recumbens							0.0226*

NOTA: '***' <0.001; '**' <0.01; '*'; <0.05; ' ' <0.1. La utilización de colores tiene como objetivo facilitar la comprensión del texto por parte del lector.

Tabla 6b. Diferencias por pares de taxones en las combinaciones de área/perímetro para **ATII**, basadas en el test post-hoc de Dunn.

ATII	cumminghiana	hookeri	Indeterminada	maculata	marticorenae	recumbens	sansebastian a
cumminghiana		1.0000	0.1707	1.0000	1.0000	1.0000	0.0109*
hookeri			0.2815	1.0000	1.0000	1.0000	0.0657
Indeterminada				0.3794	1.0000	0.3583	1.0000
maculata					1.0000	1.0000	0.1885
marticorenae						1.0000	1.0000
recumbens							0.0869

NOTA: '***' <0.001; '**' <0.01; '*'; <0.05; ' ' <0.1. La utilización de colores tiene como objetivo facilitar la comprensión del texto por parte del lector.

Tabla 6c. Diferencias por pares de taxones en las combinaciones de área/perímetro para **ATSE** basadas en el test post-hoc de Dunn.

ATSE	cumminghiana	hookeri	Indeterminada	maculata	marticorenae	recumbens	sansebastian a
cumminghiana		1	1	0.5068	1	1	0.0995
hookeri			1	1	1	1	0.0081*
Indeterminada				1	1	1	1
maculata					0.6939	1	0.0012*
marticorenae						1	0.6565
recumbens							0.0099*

NOTA: '***' <0.001; '**' <0.01; '*';<0.05; ' ' <0.1. La utilización de colores tiene como objetivo facilitar la comprensión del texto por parte del lector.

Tabla 6d. Diferencias por pares de taxones en las combinaciones de área/perímetro para **ATSI** basadas en el test post-hoc de Dunn.

ATSI	cumminghiana	hookeri	Indeterminada	maculata	marticorenae	recumbens	sansebastian a
cumminghiana		1	1	1	1	1	0.0477
hookeri			1	0.5859	1	1	0.3582
Indeterminada				0.6007	1	1	1
maculata					1	1	0.0022*
marticorenae						1	0.1190
recumbens							0.0025*

NOTA: '***' <0.001; '**' <0.01; '*';<0.05; ' ' <0.1. La utilización de colores tiene como objetivo facilitar la comprensión del texto por parte del lector.

Para la relación largo/ancho (LW) observamos las siguientes combinaciones:

Tabla 7a. Diferencias por pares de taxones en las combinaciones de largo/ancho para **ATIE** basadas en el test post-hoc de Dunn.

ATIE	cumminghiana	hookeri	Indeterminada	maculata	marticorenae	recumbens	sansebastian a
cumminghiana		0.0056*	1	1	1	0.2802	1.0000
hookeri			0.0434	1	0.0141*	1	0.0008*
Indeterminada				0.3159	1	0.2289	1
maculata					0.7565	1	0.1461
marticorenae						0.3159	1
recumbens							0.0313

NOTA: '****' <0.001; '***' <0.01; '**';<0.05; ' ' <0.1. La utilización de colores tiene como objetivo facilitar la comprensión del texto por parte del lector.

Tabla 7b. Diferencias por pares de taxones en las combinaciones de largo/ancho para **ATII** basadas en el test post-hoc de Dunn

ATII	cumminghiana	hookeri	Indeterminada	maculata	marticorenae	recumbens	sansebastian a
cumminghiana		1	0.6764	1	1	1	0.0172*
hookeri			1	1	1	1	0.9476
Indeterminada				1	1	1	1
maculata					1	1	0.9285
marticorenae						1	0.6042
recumbens							0.2208

NOTA: '****' <0.001; '***' <0.01; '**';<0.05; ' ' <0.1. La utilización de colores tiene como objetivo facilitar la comprensión del texto por parte del lector.

Tabla 7c. Diferencias por pares de taxones en las combinaciones de largo/ancho para **ATSE** basadas en el test post-hoc de Dunn.

ATSE	cumminghiana	hookeri	Indeterminada	maculata	marticorenae	recumbens	sansebastian a
cumminghiana		0.0061*	1	0.0520	1	0.1328	1
hookeri			0.9032	1	0.1126	1	0.0025*
Indeterminada				1	1	1	1
maculata					0.3243	1	0.0146*
marticorenae						0.8818	1
recumbens							0.0383

NOTA: '***' <0.001; '**' <0.01; '*'; <0.05; ' ' <0.1. La utilización de colores tiene como objetivo facilitar la comprensión del texto por parte del lector.

Tabla 7d. Diferencias por pares de taxones en las combinaciones de largo/ancho para **ATSI** basadas en el test post-hoc de Dunn.

ATSI	cumminghiana	hookeri	Indeterminada	maculata	marticorenae	recumbens	sansebastian a
cumminghiana		1	1	1	1	1	1
hookeri			1	1	1	1	1
Indeterminada				1	1	1	1
maculata					1	1	0.3452
marticorenae						1	1
recumbens							0.4197

NOTA: '***' <0.001; '**' <0.01; '*'; <0.05; ' ' <0.1. La utilización de colores tiene como objetivo facilitar la comprensión del texto por parte del lector.

Análisis no supervisado basado en mixturas Gaussianas

Finalmente, para este análisis se diferenciaron 5,3 y 2 grupos. La búsqueda se realizó usando 11 componentes principales para **CTIE**, 8 componentes para **CTII**, 6 para **CTSE** y 6 en **CTSI**. (tabla 8)

Tabla 8. Resumen de los componentes usados para el análisis no supervisado.

Grupo	N° de componentes	Componentes usados															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
CTIE	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
CTII	8	X	X	X	X	X	X	X	X								
CTSE	6	X		X	X		X			X		X					
CTSI	6	X				X	X	X	X					X			

En **CTIE** solo las muestras clasificadas como “indeterminadas” lograron llegar al 75% de predictibilidad. Para los demás especies y subespecies, la predictibilidad varió entre 0 y 53% (ver Fig. 15a). En el caso de **CTII**, al detectar 3 grupos, la predicción fue más acotada, en especial con las muestras de rótulo indeterminada, subsp. *sansebastianana* en el grupo 1, *A. cumminghiana* en el grupo 2 y *A. hookeri* subsp. *hookeri* e indeterminada en el grupo 3. A pesar de esto, ninguna combinatoria logró una predictibilidad del 70% (ver Fig. 15b). En **CTSE** la predicción agrupó a casi todas las especies y subespecies en el grupo 1; aunque al igual que en grupo anterior tampoco se llegó al mínimo de 70% de predictibilidad (ver Fig. 15c). Por último, en **CTSI**, con solo 2 grupos predichos, sí se logró el 76% para *A. cumminghiana* en el grupo 1 junto con *A. hookeri* subsp. *sansebastianana*. Si bien los demás taxones no llegaron al 70%, sólo las indeterminadas quedaron con un 50 %, siendo la predictibilidad más baja en este set de datos (ver Fig. 15d).

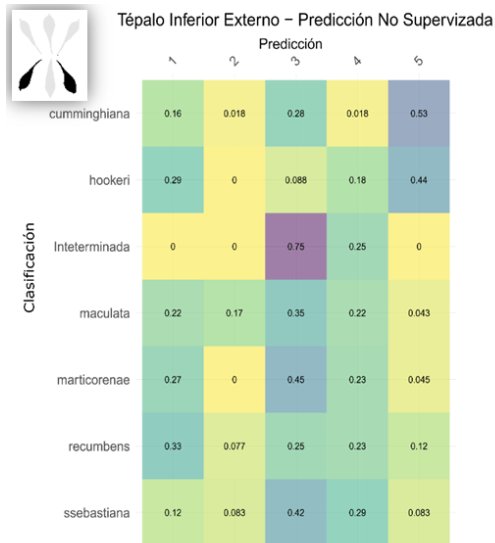


Figura 15a. Gráfico de predicción no supervisada para CTIE.

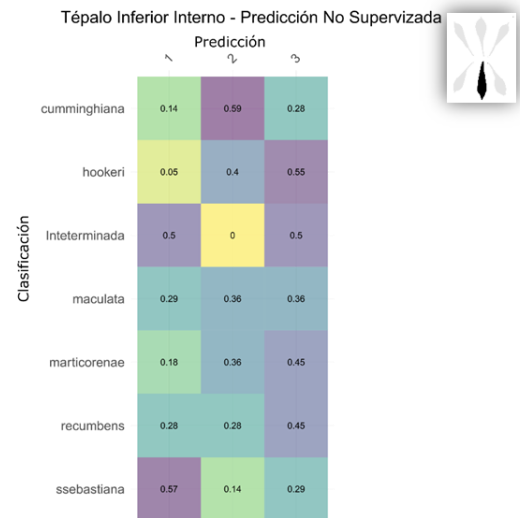


Figura 15b. Gráfico de predicción no supervisada para CTII.

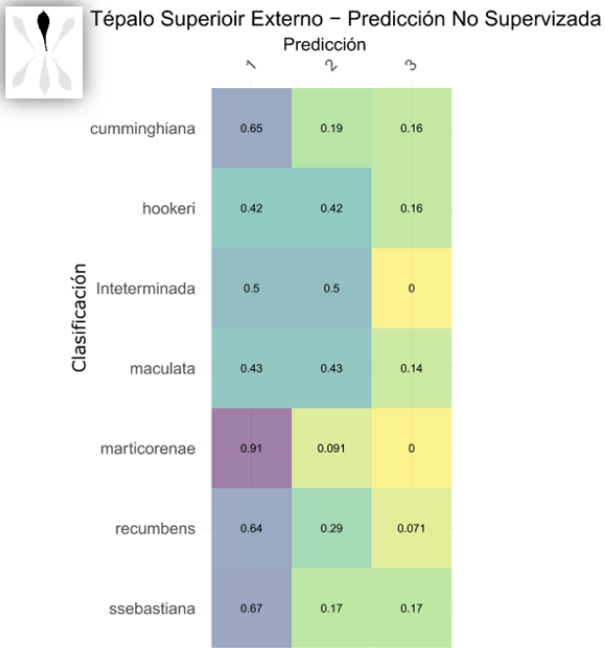


Figura 15c. Gráfico de predicción no supervisada para CTSE.

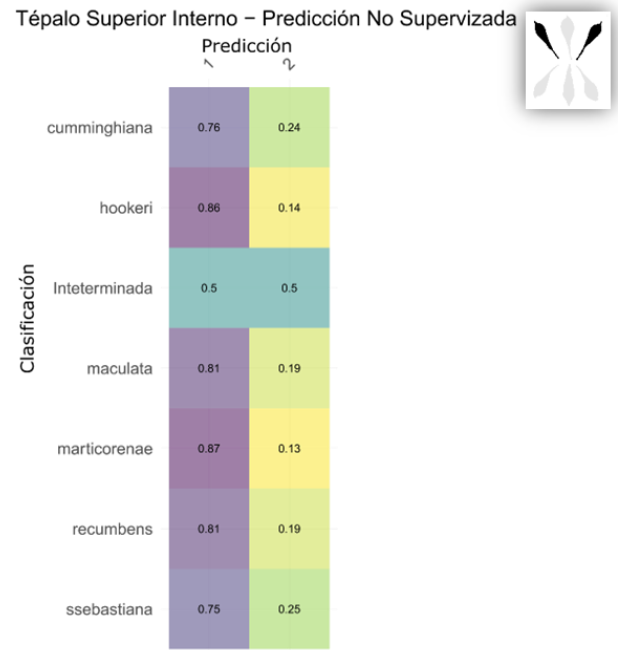


Figura 15d. Gráfico de predicción no supervisada para CTSI.

Discusión

El uso en conjunto de técnicas como MG y las elipses de Fourier permite la cuantificación de la forma del contorno de los tépalos, dado que se evalúa la silueta en su totalidad y no solo puntos de referencia como otros métodos tradicionales (Van der Niet et al., 2010; Caple, 2017). La utilización de estas técnicas en el presente trabajo reveló ciertas tendencias, lo que indicaría que hay formas que se repiten dentro de las subespecies del complejo, en *A. martcorenae*, *A. cummingiana* y en las muestras indeterminadas. A pesar de estas tendencias y de la significancia estadística de los resultados, la morfometría geométrica no fue lo suficientemente predictiva para las cuatro subespecies del complejo, dado que dentro de algunos de los taxones se encontró una excesiva variabilidad de formas.

Para el complejo de *A. hookeri*, el presente estudio es el primero que incluye a todas las subespecies, además de especies con directa relación taxonómica como son *A. cummingiana* y *A. martcorenae*. Estudios previos ya habían considerado caracteres morfológicos e isoenzimáticos (Ruiz et al. 2010) y cariológicos (Baeza et al. 2010), los que tampoco fueron concluyentes a la hora de la separación y discriminación clara entre todas las subespecies de *A. hookeri*. A pesar de ello, si fueron útiles para el reconocimiento de un nuevo taxon dentro del complejo (Baeza & Ruiz 2011) y para dar mayor evidencia para la separación de *A. cummingiana* como una especie diferente (Baeza et al. 2010).

Las elipses de Fourier resultaron útiles para la descripción de las distintas formas de los tépalos en este estudio. Los detalles de la forma se describen a partir del número de armónicos a utilizar (Rohlf & Archie 1984). En plantas, los estudios tanto florales como en hojas han utilizado distinta cantidad de armónicos, por ejemplo, 16 armónicos en guías de néctar (Medel et al., 2003), 32 en la corola (Smith & Kriebel, 2018) y 40 para hojas (Andrade et al., 2010). En este estudio se usaron entre 22 y 24 armónicos. En cuanto a la morfología floral en *A. hookeri*,

sólo se han observado diferencias morfológicas leves en el estudio de Ruiz et al. (2010). En el presente estudio, las técnicas estadísticas multivariadas demostraron diferencias significativas en la forma de cada set de datos de tépalos del complejo, no obstante, no nos permite establecer niveles de predictibilidad suficientes para ser utilizadas en un contexto taxonómico.

Mientras se presentó una solución al problema de asimetría, recortando los tépalos a los dos tercios superiores, el efecto de herradura en PCA persistió en dos sets de tépalos analizados (**CTIE** y **CTII**) (Fig. 10). Esta deformación, es generada en el Análisis de Componentes Principales porque se genera un ordenamiento a través de un gradiente de valores a lo largo de los ejes de ordenación (Podani & Miklós, 2002). En el contexto del análisis morfométrico, es posible que este efecto este demostrando una organización de tipo especular, donde los órganos se deforman desde orientaciones con asimetría de izquierda a derecha (Iwata et al. 1998). Esto podría ser un efecto del natural proceso de deformación por resupinamiento en *Alstroemeria*, el que está presente en sus hojas, pero también podría expandirse a los tépalos (Lyshede, 2002). En este sentido, a pesar de las medidas tomadas para prevenir este efecto, es posible que la deformación especular también alcance la porción de la lámina, lo que indicaría que otras aproximaciones debieran tomarse para controlar este efecto; por ejemplo, con el control de armónicos para asimetría (Iwata et al. 1998).

A pesar de que la MG no fue capaz de predecir las subespecies del complejo *A. hookeri*, se pudo observar tendencias de diferenciación (apoyados por diferencias estadísticas) que nos permite relacionar los resultados obtenidos con observaciones previas de diferenciación morfológica. Por ejemplo, Ruiz et al (2010) estudiaron la variabilidad morfológica y aloenzimática de las subespecies *hookeri* y *sansebastiana* (este último taxón aún no descrito en el 2010), sugiriendo patrones de diferenciación en caracteres florales tales como la abertura basal de los tépalos, la presencia o ausencia de mucrón y la longitud de este. Adicionalmente, descripciones morfológicas previas sugieren que la forma

de los tépalos son un carácter con potencial taxonómico en *A. hookeri*, donde destacan diferenciaciones geométricas tales como tépalos lanceolados, oblanceolados a angostamente romboidales, cortamente mucronados (típicos en subespecies *hookeri* y *sansebastianae*) y tépalos aovados, obovados a romboidales, largamente mucronados (típicos en subespecies *recumbens* y *maculata*) (Bayer 1987; Muñoz-Schick & Moreira 2003; Finot et al. 2018a y b). Interesantemente, tales deformaciones no pudieron ser capturados por el análisis de series elípticas de Fourier, dada la gran variabilidad exhibida en los tépalos evaluados (ver morfoespacio Fig. 10), lo que podría indicar que la interpretación subjetiva sobre la forma geométrica de estructuras vegetativas y reproductivas sigue siendo un fuerte componente en la diferenciación taxonómica del complejo *A. hookeri*.

A pesar de la falta de predictibilidad, si hubo entidades que evidenciaron discontinuidades notorias dentro del morfoespacio analizado con elipses de Fourier analizados. Este es el caso de *A. cummingiana*, la que mostró formas suficientemente diferenciables y predecibles a diferencia de las otras entidades del complejo *A. hookeri*, apoyando la hipótesis previa de separación de este taxón como una especie diferente (Muñoz-Schick & Moreira 2003). Distinto fue el caso de la especie recientemente descrita, *A. marticorenae* (Negritto et al., 2015), la que no presentó tépalos con variación suficiente para ser distinguida del resto de los taxones analizados. Los caracteres diagnóstico que definen esta especie (color y patrón de manchas, forma de los tépalos internos superiores, cariotipo y suelo en el que crece) no necesariamente están relacionados con forma, la cual es frecuentemente confundida con la subespecie *A. hookeri* subsp. *recumbens*, con la que actualmente comparte distribución (Finot et al. 2018a). En este sentido, los resultados sugieren que se debe adoptar una aproximación más holística para la delimitación de las entidades asociadas o que deben ser consideradas dentro del complejo *A. hookeri*.

Otro elemento importante a destacar es el rol que tuvo el análisis de medidas escalares en la delimitación de entidades, la cual resultó útil para diferenciar la subespecie *sansebastiana*, del resto de los taxones analizados, concordando con los estudios citológicos (Baeza et al. 2011), los que permitieron la descripción de esta nueva subespecie. Las medidas de L/W y A/P han sido reconocidos como medidas simples para la evaluación de estructuras como hojas, las que pueden tener un importante poder de predicción y uso como carácter diagnóstico con hojas de árboles (Weaver et al., 2020).

Para el caso del grupo de estudio, *A. hookeri* subsp. *sansebastiana* destaca por ser el único taxón con una distribución no costera, lo que podría reflejar un morfotipo divergente del resto de las subespecies, a consecuencia del aislamiento genético y adaptación local. Los tépalos más anchos y cortos que exhibe este taxón podrían relacionarse con formas florales que pueden ser distinguidos por polinizadores diferenciados, estando estas estructuras sujetas a potenciales efectos de selección positiva sobre este carácter (Rougier 2005; Cavieres et al. 1998). Otro elemento es el efecto climático, donde *A. hookeri* subsp. *sansebastiana* está sujeta a regímenes de mayor amplitud térmica y más baja humedad, lo que podría impactar también en el fenotipo floral de esta especie; sin embargo, se requiere de estudios acabados de otra naturaleza para comprobar esta hipótesis. En suma, esta diferencia es práctica para diferenciar las subespecies de la zona sur de la distribución del complejo *A. hookeri* (VII y VIII región), donde la subespecie *A. hookeri* subsp. *hookeri* se presenta en rangos costeros y es fácilmente diferenciable por el menor tamaño, coloración de sus flores y diferencias en el cariotipo (Baeza et al. 2010; Baeza & Ruiz 2011).

Limitaciones del estudio

Un elemento importante a considerar en el presente estudio es que aspectos de tipo técnico y biológico podrían influenciar los resultados y conclusiones presentados en este trabajo. Dentro del primer punto, hay que reconocer que el

proceso de reconstrucción de tépalos es muy dependiente del nivel de integridad que tienen estas estructuras previo al estirado y montado, las que mostraron diferentes niveles de degradación dependiendo de la edad y pretratamiento de secado. Cabe destacar que el tejido de los tépalos es muy delicado y fácil de romper, situación que se complica en el caso de usar material herborizado dada las limitaciones de abundancia de varios ejemplares. La otra limitación fue más de tipo biológico dado el resupinamiento de los tépalos, elemento discutido anteriormente por su efecto en la generación de patrones de asimetría y especularidad al momento de recomponer el morfoespacio. Relacionado con lo anterior, recordemos que el género *Alstroemeria* presentan hojas resupinadas, es decir, el peciolo se gira invirtiendo la hoja y deformando uno de sus lados, lo que es consecuencia del crecimiento desigual de la epidermis (Lyschede, 2002). Tal comportamiento de resupinación es consistente con la asimetría de las hojas en *Alstroemeria psittacina* (Chitwood et al., 2012). Considerando que los tépalos son, en rigor, hojas modificadas (Dickison, 1993), es posible que este efecto también podría estar teniendo un efecto en la asimetría en estructuras florales. Tal deformación puede ser muy evidente, en particular en especies con una alta deformación y recurvatura de sus tépalos, tales como *A. andina*, *A. revoluta* y *A. zoellneri* (Finot et al. 2018b). Ambas limitaciones indican que aún queda mucho por hacer para conseguir una metodología estandarizada confiable para la correcta captura de variabilidad geométrica de los tépalos en complejos de especie de *Alstroemeria*, los que podrían subsanarse con el análisis de material fresco y el uso de métodos que puedan cuantificar deformación por asimetría en formas vegetales (e.g., Iwata et al. 1998).

Conclusión

El taxónomo suele buscar nuevas herramientas que le permitan identificar y discriminar de manera certera grupos complejos, donde es difícil diferenciar

discontinuidades evidentes que permitan realizar una predicción taxonómica efectiva. Sin embargo, con este afán de encasillar las especies, se hace necesario asimilar procesos biológicos naturales que suelen dificultar esta tarea. Para el complejo de *A. hookeri* en particular, el método de descomposición por elipse de Fourier demostró tener el potencial de identificar tendencias de deformación, previamente asimiladas en tratamientos taxonómicos; sin embargo, su utilidad taxonómica quedó en duda debido a la escasa predictibilidad en los taxones analizados. Sí bien hubo diferencias morfológicas significativas observables, estas no fueron capaces de tener un patrón reconocible. En cuanto a las especies cercanas sólo *A. cummingiana* fue predicha eficazmente. Para la subespecie maculata en un 71% fue predicha como *recumbens* cuando se usó el tépalo **CTSE**. En cuanto las medidas escalares sí hubo diferencias significativas representadas principalmente por *A. hookeri* subsp. *sansebastiana*. Aun así, se puede observar una tendencia por parte de *A. cummingiana*, *A. hookeri* subsp. *hookeri*. Por todo lo dicho anteriormente se rechaza la hipótesis de este trabajo.

Referencias

- Adams, D. C. & Funk, D. J. 1997. Morphometric inferences on sibling species and sexual dimorphism in *Neochlamisus bebbianae* leaf beetles: multivariate applications of the thin-plate spline. *Systematic Biology*, 46(1):180-94.
- Adams, D. C., Rohlf, F. J. & Slice, D. E. 2013. A field comes of age: geometric morphometrics in the 21st century. *Hystrix*, 24(1) :7- 14.
- Adams, M., Raadik, T. A., Burrige, C. P. & Georges, A. 2014. Global biodiversity Assessment and Hyper-Cryptic Species Complexes: More Than One Species of Elephant in the Room? *Systematic Biology* 63: 518–533.

Andrade, I. M., Mayo, S. J., Kirkup, D., & Van den Berg, C. 2010. Elliptic Fourier Analysis of leaf outline shape in forest fragment populations of *Anthurium sinuatum* & *A. pentaphyllum* (Araceae) from Northeast Brazil. *Kew Bulletin*, 65, 3-20. <https://doi.org/10.1007/s12225-010-9188-1>

Baeza, C.M., Ruiz E. & Negritto, M. 2010. Comparative karyotypic analysis in the *Alstroemeria hookeri* Lodd. (Alstroemeriaceae) complex sensu Bayer (1987). *Genetics and Molecular Biology* 33(1): 119-124.

Baeza, C. M., & Ruiz, E. 2011. *Alstroemeria hookeri* Lodd. subsp. *sansebastianae* CM Baeza & E. Ruiz, nueva para la flora de Chile. *Gayana Botánica*, 68(2), 313-315.

Baeza, C., Finot, V. L., & Ruiz, E. 2015. Comparative karyotype analysis of populations in the *Alstroemeria presliana* Herbert (Alstroemeriaceae) complex in Chile. *Genetics and Molecular Biology*, 38, 199-204.

Baeza, C.M., Finot, V.L., Ruiz, E., Carrasco, P., Novoa, P., Stuessy, T. & González, A. 2016a. Comparative karyotypic analysis and cytotaxonomy in the *Alstroemeria ligtu* L. (Alstroemeriaceae) complex of Chile. *Brazilian Journal of Botany* 39(1): 305-313.

Baeza, C. M., Finot, V. L., Ruiz, E., Carrasco, P., Novoa, P., & Rosas, M. 2016b. Cytotaxonomic analysis in the *Alstroemeria diluta* E. Bayer (Alstroemeriaceae) complex from Chile. *Gayana Botánica*, 73(2), 220-225.

Baeza, C. M., Finot, V., Ruiz, E., Carrasco, P., Novoa, P., Rosas, M., & Toro-Núñez, O. 2018a. Cytotaxonomic study of the Chilean endemic complex *Alstroemeria magnifica* Herb. (Alstroemeriaceae). *Genetics and Molecular Biology*, 41, 434-441.

Baeza, C., Toro, O., Ruiz, E., Finot, V., Carrasco, P., & Villalobos, N. 2018b. Polimorfismo de tamaño entre cromosomas homólogos, un caso extremo en

Alstroemeria pulchra Sims. (Alstroemeriaceae), especie endémica de Chile. *Gayana. Botánica*, 75(2), 663-666.

Bayer, E. 1987. Die Gattung *Alstroemeria* in Chile. *Mitteilungen Botanischen Staatssammlung Munchen* 24:1 -362

Benítez, H. A., & Püschel, T. A. 2014. Modelando la varianza de la forma: morfometría geométrica aplicaciones en biología evolutiva. *International Journal of Morphology*, 32(3), 998-1008.

Bonhomme V., Picq, S., Gaucherel, C. & Claude, J. 2014. Momocs: Outline analysis using R. *Journal of Statistical Software* 56(13): 1-24 URL <http://www.jstatsoft.org/v56/i13/>.

Bookstein, F. 1991. Morphometric tools for landmark data. Geometry and biology. Cambridge University Press, New York.

Cadena, C. D., Zapata, F., & Jiménez, I. 2018. Issues and perspectives in species delimitation using phenotypic data: Atlantean evolution in Darwin's finches. *Systematic Biology*, 67(2), 181-194.

Caple, J., Byrd, J. & Stephan, C.N. 2017. Elliptical Fourier analysis: fundamentals, applications, and value for forensic anthropology. *International Journal of Legal Medicine* 131, 1675–1690.

Carstens, B. C., Pelletier, T. A., Reid, N. M., & Satler, J. D. 2013. How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology*. 22: 4369–4383. doi:10.1111/mec.12413.

Cavieres, L., Peñaloza, A.P & Arroyo, M.T. 1998. Efectos del tamaño floral y densidad de flores en la visita de insectos polinizadores en *Alstroemeria pallida* Graham (Amaryllidaceae). *Gayana Botanica* 55:1-10.

Charlin, J. & Hernández, M. I. 2016. Morfometría geométrica y representaciones rupestres: explorando las aplicaciones de los métodos basados en landmarks. *Arqueología* 22(1): 103-125.

Chitwood, D. H., Naylor, D. T., Thammapijai, P., Weeger, A. C., Headland, L. R., & Sinha, N. R. 2012. Conflict between intrinsic leaf asymmetry and phyllotaxis in the resupinate leaves of *Alstroemeria psittacina*. *Frontiers in plant science*, 3, 182.

Currie, A. J., Ganeshanandam, S., Noiton, D. A., Garrick, D., Shelbourne, C. J. A., & Oraguzie, N. 2000. Quantitative evaluation of apple (*Malus × domestica* Borkh.) fruit shape by principal component analysis of Fourier descriptors. *Euphytica*, 111, 221-227.

de Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56: 879–886. doi:10.1080/10635150701701083.

Dell'Anna, R., Lazzeri, P., Frisanco, M., Monti, F., Malvezzi Campeggi, F., Gottardini, E., & Bersani, M. 2009. Pollen discrimination and classification by Fourier transform infrared (FT-IR) microspectroscopy and machine learning. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 394, 1443-1452.

Dickison, W.C., 1993. "Floral and anatomy of the Styracaceae, including observations on intra-ovarian trichomes". *Botanical Journal of the Linnean Society*. 112: 223–255.

Dinno, A. 2015. Nonparametric pairwise multiple comparisons in independent groups using Dunn's test. *The Stata Journal*, 15(1), 292-300.

Dinno, A., & Dinno, M. A. 2017. Package 'dunn. test'. *CRAN Repos*, 10, 1-7.

Elizondo, J. E., & Maestre, L. P. 2005. Fundamentos de procesamiento de imágenes. Mexicali: Universidad Autónoma de Baja California.

Ezard, T. H., Pearson, P. N., & Purvis, A. 2010. Algorithmic approaches to aid species' delimitation in multidimensional morphospace. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 1-11.

Finot, V. L., Baeza, C. M., Melín, P., Novoa, P., Campos, J., Ruiz, E., ... & Carrasco, P. 2015. ¿Es *Alstroemeria pulchra* Sims var? maxima Phil. (Alstroemeriaceae) un miembro del complejo *A. magnifica* Herbert?: Estudio colorimétrico de los tépalos externos e internos de la flor. *Gayana. Botánica*, 72(1), 101-113.

Finot, V. L., Baeza, C. M., Ruiz, E., Carrasco, P., & Melín, P. S. 2016. Análisis colorimétrico y morfométrico de la flor de *Alstroemeria presliana* (Alstroemeriaceae). *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 89-108.

Finot, V. L., Baeza, C. M., Ruiz, E., Toro, O., & Carrasco, P. 2018a. Towards an Integrative Taxonomy of the Genus *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) in Chile: A Comprehensive Review. *Selected Studies in Biodiversity*. doi:10.5772/intechopen.71823

Finot, V., Baeza, C., Muñoz-Schick, M., Ruiz, E., Espejo, J., Alarcón, D., ... & Eyzaguirre, M. T. 2018b. Guía de Campo Alstroemerias Chilenas. *Corporación Chilena de la Madera: Concepción, Chile*, 1-292.

Flot, J. F., Couloux, A., & Tillier, S. 2010. Haplowebs as a graphical tool for delimiting species: a revival of Doyle's "field for recombination" approach and its application to the coral genus *Pocillopora* in Clipperton. *BMC Evolutionary Biology*. 10: 372. doi:10.1186/1471-2148-10-372.

Flot, J. F. 2015. Species delimitation's coming of age. *Systematic Biology*, 64: 897–899. doi:10.1093/sysbio/syv071.

- Franz, E., Gebhardt, M. R., & Unklesbay, K. B. 1991. The use of local spectral properties of leaves as an aid for identifying weed seedlings in digital images. *Transactions of the ASAE*, 34(2), 682-0687.
- Fu, P.-C., Sun, S.-S., Khan, G., Dong, X.-X., Tan, J.-Z., Favre, A., Zhang, F.-Q. & Chen, S.-L. 2020. Population subdivision and hybridization in a species complex of *Gentiana* in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Annals of Botany* 125: 677–690.
- Ginsberg, P. S., Humphreys, D. P. & Dyer, K. A. 2019. Ongoing hybridization obscures phylogenetic relationships in the *Drosophila subquinaria* species complex. *Journal of Evolutionary Biology* 32: 1093–1105.
- Gottardini, E., Rossi, S., Cristofolini, F., & Benedetti, L. 2007. Use of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy as a tool for pollen identification. *Aerobiologia*, 23, 211-219.
- Hernández, M. 2013. Identificación de las subespecies de *Magnolia cubensis* (Magnoliaceae) mediante análisis digital de imágenes de las hojas. *Revista cubana de ciencias biológicas*. 53-60pp.
- Hörandl, E., J. Greilhuber, K. Klímová, O. Paun, E. Temsch, K. Emadzade, & I. Hodálová. 2009. Reticulate evolution and taxonomic concepts in the *Ranunculus auricomus* complex (Ranunculaceae): insights from analysis of morphological, karyological and molecular data. *TAXON* 58: 1194–1216.
- Hošková, K., Pokorná, A., Neustupa, J., & Pokorný, P. 2021. Inter-and intraspecific variation in grass phytolith shape and size: a geometric morphometrics perspective. *Annals of botany*, 127(2), 191-201.
- Hurley, J. R., & Cattell, R. B. 1962. The Procrustes program: Producing direct rotation to test a hypothesized factor structure. *Behavioral Science*, 7(2), 258.

- Iwata, H., Niikura, S., Matsuura, S., Takano, Y., & Ukai, Y. (1998). Evaluation of variation of root shape of Japanese radish (*Raphanus sativus* L.) based on image analysis using elliptic Fourier descriptors. *Euphytica*, 102, 143-149.
- Lestrel, P. 1997. Fourier descriptors and their applications in biology. Cambridge University Press, Cambridge; New York
- Lyshede, O. B. 2002. Comparative and functional leaf anatomy of selected Alstroemeriaceae of mainly Chilean origin. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 140(3), 261-272.
- Mayr, E. 1942. Birds collected during the Whitney South Sea Expedition. 48, Notes on the Polynesian species of *Aplonis*. *American Museum novitates*; no. 1166.
- McLachlan G.J. 2004. *Discriminant analysis and statistical pattern recognition*. Hoboken (NJ): John Wiley and Sons (Series in probability and statistics).
- McLachlan, G. J., & Krishnan, T. 2007. *The EM algorithm and extensions*. John Wiley & Sons.
- Medel, R., Botto-Mahan, C., & Kalin-Arroyo, M. 2003. Pollinator-mediated selection on the nectar guide phenotype in the Andean monkey flower, *Mimulus luteus*. *Ecology*, 84(7), 1721-1732.
- Microsoft Corporation. 2018. *Microsoft Excel*. Retrieved from <https://office.microsoft.com/excel>
- Muñoz-Schick, M., & A. Moreira-Muñoz. 2003. Alstroemerias de Chile. Taller La Era, Santiago, Chile.
- Negritto, M. A., Baeza, C. M., Ruiz, E., & Novoa, P. 2015. *Alstroemeria marticorenae* (Alstroemeriaceae), a new species from central Chile. *Systematic Botany*, 40(1), 69-74.

Neto, J. C., Meyer, G. E., Jones, D. D., & Samal, A. K. 2006. Plant species identification using Elliptic Fourier leaf shape analysis. *Computers and electronics in agriculture*, 50(2), 121-134.

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'hara, R. B., ... & Oksanen, M. J. 2013. Package 'vegan'. *Community ecology package, version*, 2(9), 1-295.

Pinheiro, F., Dantas-Queiroz, M. V., & Palma-Silva, C. 2018. Plant species complexes as models to understand speciation and evolution: a review of South American studies. *Critical Reviews in Plants Sciences* 37: 54–80.

Podani, J., & Miklós, I. 2002. Resemblance coefficients and the horseshoe effect in principal coordinates analysis. *Ecology*, 83(12), 3331-3343.

R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Raftery, A. E., & Dean, N. 2006. Variable selection for model-based clustering. *Journal of the American Statistical Association*, 101(473), 168-178.

Rasband, W.S., ImageJ, U. S. 1997-2018. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>.

Rodríguez, R., Marticorena, C., Alarcón, D., Baeza, C., Cavieres, L., Finot, V.L., Fuentes, N., Kiessling, A., Mihoc, M., Pauchard, A., Ruiz, E., Sánchez, P. & Marticorena, A. 2018. Catálogo de las plantas vasculares de Chile. *Gayana Botanica*, 75(1): 1-430.

Rohlf, F. J. & Archie, J. W. 1984. A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Systematic Zoology*, 33, 302-317.

Rohlf, F. J. & Slice, D. 1990. Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology*. 39(1):40- 59.

Rohlf, F. J. & Marcus, L. F. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution*. 8(4):129-32.

Rohlf, F. J.; Loy, A. & Corti, M. 1996. Morphometric analysis of old world talpidae (Mammalia, Insectivora) using partial-warp scores. *Systematics Biology*. 45(3):344-62.

Rougier, D. 2005. Evolución de caracteres florales relacionados con el sistema de reproducción en el género *Alstroemeria* L. (Alstroemeriaceae) en Chile. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Ruiz, E., Balboa, K., Negritto, M. A., Baeza, C. M., Fuentes, G., & Briceño, V. 2010. Variabilidad genética y morfológica y estructuración poblacional en *Alstroemeria hookeri* subsp. *hookeri* (Alstroemeriaceae), endémica de Chile. *Revista chilena de historia natural*, 83(4), 605-616.

Schrader, J., Shi, P., Royer, D. L., Peppe, D. J., Gallagher, R. V., Li, Y., ... & Wright, I. J. 2021. Leaf size estimation based on leaf length, width and shape. *Annals of Botany*, 128(4), 395-406.

Scrucca, L., Fop, M., Murphy, T. B., & Raftery, A. E. 2016. mclust 5: clustering, classification and density estimation using Gaussian finite mixture models. *The R journal*, 8(1), 289.289–317. <https://doi.org/10.32614/RJ-2016-021>.

Shinoda K & M Murata. 2003. Cross-compatibility in interspecific hybridization of fifteen *Alstroemeria* species. *Journal of Japanese Society for Horticultural Science* 72: 557-561.

Sites, J. W., & Marshall, J. C. 2003. Delimiting species: a renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution* **18**: 462–470. doi:10.1016/S0169-5347(03)00184-8.

Smith, S. D., & Kriebel, R. 2018. Convergent evolution of floral shape tied to pollinator shifts in *Lochrominae* (Solanaceae). *Evolution*, 72(3), 688-697. <https://doi.org/10.1111/evo.13416>

Stace, C. A. 1991. *Plant taxonomy and biosystematics*. Cambridge University Press.

Stuessy, T. F. 2009. *Plant taxonomy: the systematic evaluation of comparative data*. Columbia University Press. Columbia University Press, New York, USA. 539 pp.

The GIMP Development Team. 2019. GIMP. Version 2.10.12. Retrieved from <https://www.gimp.org>

Van der Niet, T., Zollikofer, C. P., de León, M. S. P., Johnson, S. D., & Linder, H. P. 2010. Three-dimensional geometric morphometrics for studying floral shape variation. *Trends in plant science*, 15(8), 423-426.

Vacárel V. & Vargas, P. 2010. Quantitative morphology and species delimitation under the general lineage concept: optimization for *Hedera*. *American Journal of Botany* 97(9): 1555-1573.

Varela, A. I., & Haye, P. A. 2012. The marine brooder *Excirolana braziliensis* (Crustacea: Isopoda) is also a complex of cryptic species on the coast of Chile. *Revista chilena de historia natural* 85: 495–502.

Victoriano, P. F., Muñoz-Mendoza, C., Sáez, P. A., Salinas, H. F., Muñoz-Ramírez, C., Sallaberry, M., Fibla, P. & Méndez, M. A. 2015. Evolution and Conservation on Top of the World: Phylogeography of the Marbled Water Frog (*Telmatobius marmoratus* Species Complex; Anura, Telmatobiidae) in Protected Areas of Chile. *Journal of Heredity* 106: 546–559.

Viscosi, V. 2015. Geometric morphometrics and leaf phenotypic plasticity: assessing fluctuating asymmetry and allometry in European white oaks (*Quercus*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 179(2), 335-348.

Weaver, W. N., Ng, J., & Laport, R. G. 2020. LeafMachine: Using machine learning to automate leaf trait extraction from digitized herbarium specimens. *Applications in Plant Sciences*, 8(6), e11367.

Webster, M. & Sheets, H.D. 2010. A practical introduction to landmark-based geometric morphometrics. En *Quantitative Methods in Paleobiology*, editado por J. Alroy y G. Hunt, pp. 163-188. The Paleontological Society Papers, Volume 16. The Paleontological Society.

Wiens, J. J. 2007. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Systematic biology*, 56(6), 875-878.

Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., & Sheets, H. D. 2004. *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. San Diego, California, USA: Elsevier Academic Press.